

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

Exhibit no. 03

of the letter / report / expert  
opinion / plaint / defense

dated 24/3/10

HOFFMANN · EITLÉ  
Patent- und Rechtsanwälte  
81925 München, Arabellastr. 4

24 497 Da

(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, 15/06, 5/20 // (C12P 21/08, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/17197
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日	PCT/JP94/00089 1994年1月24日(24. 01. 94)	(43) 国際公開日 1994年8月4日(04.08.94)
(30) 優先権データ 特願平5/10132 1993年1月25日(25. 01. 93) JP 特願平5/19035 1993年2月5日(05. 02. 93) JP 特願平5/286985 1993年11月16日(16. 11. 93) JP 特願平5/334773 1993年12月28日(28. 12. 93) JP	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 鈴木伸宏(SUZUKI, Nobuhiro)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市大字谷田部1077番地の50 Ibaraki, (JP) 尾高麻乃(ODAKA, Asano)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市吾妻3丁目11番5号 ヴェルンハイムK 403号 Ibaraki, (JP) 北田千恵子(KITADA, Chieko)(JP/JP) 〒590 大阪府堺市南向陽町1丁2番8号 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 大多和明敏, 外(OHTAWA, Akitoshi et al.) 〒105 東京都港区西新橋二丁目3番2号 ニュー栄和ビルディング Tokyo, (JP)		

(54) Title: ANTIBODY AGAINST  $\beta$ -AMYLOID OR DERIVATIVE THEREOF AND USE THEREOF(54) 発明の名称  $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体およびその用途

## (57) Abstract

Novel antibodies useful because of having the binding specificity for  $\beta$ -amyloid or derivatives thereof with  $\beta$ -amyloid acting as an immunogen, or monoclonal antibodies which recognize the N-terminus, C-terminus and central portion, respectively, of  $\beta$ -amyloid. The combination of these antibodies provides an assay method whereby  $\beta$ -amyloid can be specifically determined with a high sensitivity. This method is useful for diagnosing diseases in which  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof participates, such as Alzheimer's disease, and the antibodies are useful for developing preventive or therapeutic agents for Alzheimer's disease.

(57) 要約

本発明は、 $\beta$ -アミロイドを免疫原として、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に結合特異性を有する点で有用かつ新規な抗体、即ち $\beta$ -アミロイドのN端部、C端部または中心部をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を得た。これら抗体を組み合わせることにより $\beta$ -アミロイドを感度よく特異的に定量することができる測定法を提供する。この定量法は $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が関与する疾患（例えば、アルツハイマー病など）の診断に有用であり、本発明の抗体はアルツハイマー病の予防・治療剤の開発に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュー・ジーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MD	モルドバ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	ML	マリ	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	TG	トゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	TT	トリニダードトバゴ
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KE	ケニア	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェコスロヴァキア	KG	キルギスタン			VN	ヴェトナム

## 明 細 書

 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体およびその用途

## 技術分野

本発明は、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に結合特異性を有する点で有用かつ新規な抗体に関する。更に詳しくは、抗原抗体反応に基づく $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の測定法の開発、あるいは $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に関与する疾患（例えば、アルツハイマー病など）の診断あるいはアルツハイマー病の予防・治療剤の開発に有用な抗体に関する。

## 背景技術

アルツハイマー病による老人性痴呆は大きな社会的問題となっており、アルツハイマー病の診断および治療方法の早期確立が望まれてきた。アルツハイマー病患者の脳に特徴的な病変として、老人斑の過剰な形成および神経原繊維変化が知られており、これらのうち老人斑の主要な構成成分の一つが $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体である。

$\beta$ -アミロイドは、約40個のアミノ酸からなるペプチドであり、アミロイド前駆体蛋白質（Amyloid Precursor Protein：以下、APPと称する）の細胞膜貫通領域の近傍にコードされている。 $\beta$ -アミロイドのアミノ酸配列を以下に示す。

[ $\beta$ -アミロイド（1-38）] 配列番号：1

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-  
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-  
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-  
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly

〔 $\beta$ -アミロイド (1-39)〕 配列番号：2

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-  
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-  
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-  
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val

〔 $\beta$ -アミロイド (1-40)〕 配列番号：3

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-  
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-  
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-  
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

〔 $\beta$ -アミロイド (1-41)〕 配列番号：4

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-  
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-  
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-  
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-  
Ile

〔 $\beta$ -アミロイド (1-42)〕 配列番号：5

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-  
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-  
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-  
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-  
Ile-Ala

〔 $\beta$ -アミロイド (1-43)〕 配列番号：6

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-  
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-  
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-

Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-  
Ile-Ala-Thr。

最近、家族性アルツハイマー病患者のなかに、A P Pの点突然変異を有する家系が報告されており、 $\beta$ -アミロイドがアルツハイマー病の原因物質の一つである可能性が指摘された。このような背景から、 $\beta$ -アミロイドはアルツハイマー病研究の中心的な課題として極めて精力的に研究され、種々の研究成果が発表されてきた。

しかし、このように $\beta$ -アミロイドに深い関心が寄せられているにもかかわらず、これまで $\beta$ -アミロイドを簡便に高感度に検出する測定系に関する報告はほとんど発表されておらず、僅かに、P. Seubertらにより、 $\beta$ -アミロイドのサンドイッチ酵素免疫測定法の報告がなされたに過ぎない (Nature, 359, 325-327, 1992)。このP. Seubertらの測定法の検出感度は100 pg/mlと報告されており、満足できる感度とはいえない。また、該測定法は $\beta$ -アミロイドのN端28残基からなる部分ペプチド〔 $\beta$ -アミロイド(1-28)と略す〕とも反応すると報告されている。しかしながら、 $\beta$ -アミロイドのC端部、 $\beta$ -アミロイド(29-39)、 $\beta$ -アミロイド(29-40)、 $\beta$ -アミロイド(29-41)、 $\beta$ -アミロイド(29-42)あるいは $\beta$ -アミロイド(29-43)には疎水的アミノ酸が数多く存在することから、細胞膜に埋め込まれている領域と考えられており、この部分がペプチドの凝集や沈着に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、C端部疎水的領域を有する $\beta$ -アミロイドを測定することが重要であると言えるが、上記のP. Seubertらの方法は、該特異性および感度の点で、社会的要求を満足していないものである。

通常、ペプチドに対する抗体は、該ペプチドと天然あるいは合成高分子担体との複合体を免疫することにより作製されており、 $\beta$ -アミロイ

ドの場合にも、親水性領域である $\beta$ -アミロイドN端部、例えば $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫原として $\beta$ -アミロイド(1-40)と反応する抗体を作製し得ることは、前述したP. Seubertらの報告からも示される。しかしながら、細胞膜に埋め込まれるような疎水的領域である $\beta$ -アミロイドのC端部に対する抗体を通常の方法で作製し得るかどうかは明らかではない。さらに、仮にそのような領域に対する抗体が得られたとしても、その抗体が $\beta$ -アミロイドと反応するという保証は全くない。さらに、仮にその抗体が $\beta$ -アミロイドに対して極めて低い親和性しか示さなかった場合、その抗体を用いて、例えば前述したP. Seubertらの報告したようなサンドイッチ酵素免疫測定法を構築し得ること期待することは一般的には困難である。即ち、これまでも、 $\beta$ -アミロイドの検出を目的としてさまざまな抗体が作製されてきたにもかかわらず、 $\beta$ -アミロイドC端部に対する抗体を作製し、該抗体をサンドイッチ-免疫測定法に適用することにより、 $\beta$ -アミロイド(1-28)と交差反応することなしに $\beta$ -アミロイドを高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発したという報告はない。また、 $\beta$ -アミロイド(25-35)は、タヒキニンとアミノ酸配列上の類似性が存在し、細胞毒性を有することが報告されている(B. A. Yankner et. al. Science, 250, 279-282, 1990)。しかしながら、 $\beta$ -アミロイド(25-35)に対する抗体を作製し、該抗体をサンドイッチ-免疫測定法に適用することにより、 $\beta$ -アミロイド(1-28)と交差反応することなしに $\beta$ -アミロイドを高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発したという報告は全くない。

さらに最近では、 $\beta$ -アミロイドのなかでも、大脳実質中(老人斑)には $\beta$ -アミロイド(1-42)が主に沈着し、一方脳血管には $\beta$ -アミロイド(1-40)が主に沈着する(アミロイドアンギオパチー)ことが報告されている(アーチブス オブ バイオケミストリー アンド

バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.), 301, 41-53, 1993)。  
また、 $\beta$ -アミロイド (1-42)、 $\beta$ -アミロイド (26-42)、  
 $\beta$ -アミロイド (26-43)、 $\beta$ -アミロイド (34-42) などのC  
端部分を含むペプチドが種となって、水溶性の $\beta$ -アミロイド (1-4  
0) などの沈着を招くことなどが示唆されている (バイオケミストリー  
(Biochemistry), 32, 4693-4697, 1993)。このような報告から、 $\beta$ -  
アミロイド (1-40) と $\beta$ -アミロイド (1-42) との沈着様式の  
相違がアルツハイマー病に大きく関与していると考えられる。したがっ  
て、アルツハイマー病の診断を行うには、 $\beta$ -アミロイド (1-40)  
と $\beta$ -アミロイド (1-42) とを感度良く分別定量することが重要な  
課題となってくる。しかしながら、このような課題を解決できる抗体は  
未だ報告されていない。

本発明は、C端部疎水的領域を有する $\beta$ -アミロイドまたはその誘導  
体を感度よく特異的に定量することができる新規抗体、好ましくはモノ  
クローナル抗体、および該抗体を用いる $\beta$ -アミロイドまたはその誘導  
体の測定法を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、 $\beta$ -  
アミロイドまたはその誘導体の異なる部分を認識する複数のモノクロ  
ーナル抗体を作製し、該抗体を用いる $\beta$ -アミロイドの優れた測定法を  
開発した。そして、さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至っ  
た。

すなわち、本発明は、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部  
分ペプチドに特異的に反応する抗体 (好ましくは、モノクローナル抗体)  
、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に

反応するモノクローナル抗体、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該抗体およびハイブリドーマ細胞の製造法、該抗体を用いた競合法あるいはサンドイッチ法による $\beta$ -アミロイドおよびその誘導体の免疫測定法（アルツハイマー病などの診断方法）に関する。

さらに詳しくは、本発明者らは $\beta$ -アミロイド（25-35）、 $\beta$ -アミロイド（35-43）、 $\beta$ -アミロイド（1-40）および $\beta$ -アミロイド（1-16）を免疫原として、モノクローナル抗体を複数作製し、これらを組み合わせることにより、 $\beta$ -アミロイド（1-28）と交差反応することなしに $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体を高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発した。すなわち、 $\beta$ -アミロイド（25-35）、 $\beta$ -アミロイド（35-43）および $\beta$ -アミロイド（1-40）を免疫原として $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端部を認識するモノクローナル抗体、例えばBA-27a、BS-85aおよびBC-05aを確立した。それらのうち、BS-85aおよびBA-27aは、標識化した $\beta$ -アミロイドを用いる競合法免疫測定法ではいずれも $\beta$ -アミロイドに対して極めて低い親和性しか示さないにもかかわらず、 $\beta$ -アミロイドのN端部（ $\beta$ -アミロイド（1-16））に対するモノクローナル抗体のなかから特に選択された2種類の抗体、すなわちBAN-052aおよびBAN-50aと組み合わせることにより、 $\beta$ -アミロイドに対して極めて高感度なサンドイッチ-免疫測定法を提供できることが明かとなった。また、BC-05aとBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ-免疫測定法は、 $\beta$ -アミロイド（1-40）と交差反応することなく、アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中の $\beta$ -アミロイドを高感度に検出することが明かとなった。さらに、本発明



者らは、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体、例えばBP-90aを確立した。

本発明の大きな特徴の1つは、 $\beta$ -アミロイド(1-40)と $\beta$ -アミロイド(1-42)とを高感度に分別定量することができるサンドイッチ定量法を提供できることである。すなわち、BA-27aとBAN-052aまたはBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ定量法では $\beta$ -アミロイド(1-40)を検出できるが $\beta$ -アミロイド(1-42)は検出しない、またBC-05aとBAN-052aまたはBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ定量法では $\beta$ -アミロイド(1-42)を検出できるが $\beta$ -アミロイド(1-40)は検出しない、さらにBS-85aとBAN-052aまたはBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ定量法では $\beta$ -アミロイド(1-40)および $\beta$ -アミロイド(1-42)を検出することができる。したがって、本発明のモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ定量法によって、 $\beta$ -アミロイド(1-40)と $\beta$ -アミロイド(1-42)とを高感度に分別定量することができる。このような技術は、公知技術からは全く類推できない驚くべき知見である。

より具体的には、本発明は、

- (1)  $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体、
- (2) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする第(1)項記載の抗体、
- (3) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする第(1)項記載の抗体、

(4) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする第(1)項記載の抗体、

(5) 抗体がモノクローナル抗体である第(1)ないし(4)項記載の抗体、

(6) 第(5)項記載モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(7) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび(または)配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応するBAN-052aで標示されるモノクローナル抗体、

(8) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび(または)配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体、

(9) 第(7)項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(10) 第(8)項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(11) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体、

(12) 抗体がモノクローナル抗体である第(11)項記載の抗体、

(13) 第(12)項記載モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(14) 第(1)、第(7)、第(8)または第(11)項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

(15) 第(1)項記載の抗体と、第(7)または第(8)項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドの定量法、

(16) 第(11)項記載の抗体と、第(1)、第(7)または第(8)項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドの定量法および

(17) アルツハイマー病の診断に用いられる第(14)～(16)項記載の定量法に関する。

上記(1)の好ましい態様は、

(18)  $\beta$ -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第(1)項記載の抗体、

(19)  $\beta$ -アミロイドの誘導体が 配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、 配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、 配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは 配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第(1)項記載の抗体、

(20)  $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドのC

端側の部分ペプチドが、 $\beta$ -アミロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである第(1)項記載の抗体、

(21) 抗体が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする第(1)、(18)ないし(20)項記載の抗体、

(22) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする第(1)、(18)ないし(21)項記載の抗体および

(23) 抗体が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする第(1)、(18)ないし(21)項記載の抗体である。

上記(2)の好ましい態様は、

(24) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドおよび(または)配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体および

(25) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドを認識することを特徴とする第(24)項記載の抗体である。

上記(3)の好ましい態様は、

(26) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有す

る $\beta$ -アミロイド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドおよび（または）配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体である。

上記（4）の好ましい態様は、

（27）配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とするアルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、

（28）アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドである第（27）項記載の抗体および

（29）配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドおよび配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイドを認識しないことを特徴とする第（28）項記載の抗体である。

上記（5）の好ましい態様は、

（30）BA-27aで標示される第（24）または（25）項記載のモノクローナル抗体、

（31）BS-85aで標示される第（26）項記載のモノクローナル抗体および

（32）BC-05aで標示される第（27）ないし（29）項記載のモノクローナル抗体である。

特に、

（33） $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測

定法による定量に用いられる第（１）ないし（５）および第（１８）ないし（３２）項記載の抗体が好ましい。

上記（６）の好ましい態様は、

（３４）第（３０）項記載モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

（３５）第（３１）項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞および

（３６）第（３２）項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞である。

上記（７）および（８）の好ましい態様としては、

（３７） $\beta$ -アミロイドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５または配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（７）または（８）項記載のモノクローナル抗体、

（３８） $\beta$ -アミロイドの誘導体が 配列番号：５で表されるアミノ酸配列の第２番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチド、 配列番号：５で表されるアミノ酸配列の第３番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチドまたは 配列番号：５で表されるアミノ酸配列の第４番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドである第（７）または（８）項記載の抗体および

（３９） $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる第（７）、（８）、（３７）または（３８）項記載の抗体である。

上記（１１）の好ましい態様としては、

（４０） $\beta$ -アミロイドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、

配列番号： 4、配列番号： 5または配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（41） $\beta$ -アミロイドの誘導体が 配列番号： 5 で表されるアミノ酸配列の第2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、 配列番号： 5 で表されるアミノ酸配列の第3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、 配列番号： 5 で表されるアミノ酸配列の第4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは 配列番号： 1～配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（42） $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号： 1～配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（43） $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（44）抗体が配列番号： 11 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを認識することを特徴とする第（11）、（40）ないし（43）記載の抗体および

（45） $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる第（11）、（40）ないし（44）項記載の抗体である。

上記（12）の好ましい態様としては、

(46) BP-90aで標示される第(12)項記載のモノクローナル抗体である。

上記(13)の好ましい態様としては、

(47) 第(46)項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞である。

上記(14)の好ましい態様としては、

(48) 第(1)、第(7)、第(8)または第(11)項記載の抗体と、被検液および標識化 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法である。

上記(15)の好ましい態様としては、

(49) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することとを特徴とし、担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が第(1)項記載の抗体であり、他方が配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体であることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

(50) 配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第(49)項記載の定量法、

(51) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化



された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBA-27a、BS-85aまたはBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第(49)項記載の定量法、

(52) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBA-27aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第(49)項記載の定量法、

(53) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBS-85aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第(49)項記載の定量法および

(54) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはそ

の誘導体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（49）項記載の定量法である。

上記（16）の好ましい態様としては、

（55）担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とし、担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が第（11）項記載の抗体であり、他方が第（1）項記載の抗体または配列番号：7もしくは配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体であることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

（56）配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第（55）項記載の定量法、

（57）担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBA-27a、BS-85a、BC-05a、BAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第（55）項記載の定量法、

（58）担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配

列番号：２で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：３で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：４で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、および（または）配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（５５）項記載の定量法および

（５９）担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がＢＰ－９０ａで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がＢＡ－２７ａ、ＢＳ－８５ａまたはＢＣ－０５ａで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：１～配列番号：６で表されるアミノ酸配列から第１番目～１６番目のアミノ酸配列または第１番目～１７番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（５５）項記載の定量法である。

なお、本発明で得られた抗 $\beta$ -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、ＢＡＮ－０５２、ＢＡ－２７およびＢＳ－８５は平成４年１２月２２日から財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）に、そして平成５年１月７日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所（ＮＩＢＨ）に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞	ＩＦＯ	FERM-BP(NIBH)
ＢＡＮ－０５２	５０３８６	４１３８
ＢＡ－２７	５０３８７	４１３９
ＢＳ－８５	５０３８８	４１４０

また、本発明で得られたハイブリドーマ細胞のうち、ＢＡＮ－５０は平成５年１月８日から財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）に、そして平成５年１月２７日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所（ＮＩＢＨ）に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞	I F O	FERM-BP (NIBH)
B A N - 5 0	5 0 3 9 0	4 1 6 3

さらに、本発明で得られたハイブリドーマ細胞のうち、B C - 0 5 および B P - 9 0 は平成 5 年 1 1 月 2 日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所 (N I B H) に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞	FERM-BP (NIBH)
B C - 0 5	4 4 5 7
B P - 9 0	4 4 5 8

なお、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後に a を付けた形で表している。

本明細書において用いられる配列番号のうち、配列番号：1～配列番号：12 は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：1〕  $\beta$ -アミロイド (1-38)

〔配列番号：2〕  $\beta$ -アミロイド (1-39)

〔配列番号：3〕  $\beta$ -アミロイド (1-40)

〔配列番号：4〕  $\beta$ -アミロイド (1-41)

〔配列番号：5〕  $\beta$ -アミロイド (1-42)

〔配列番号：6〕  $\beta$ -アミロイド (1-43)

〔配列番号：7〕  $\beta$ -アミロイド (1-28)

〔配列番号：8〕  $\beta$ -アミロイド (25-35)

〔配列番号：9〕  $\beta$ -アミロイド (35-43)

〔配列番号：10〕  $\beta$ -アミロイド (1-16)

〔配列番号：11〕  $\beta$ -アミロイド (17-28)

〔配列番号：12〕  $\beta$ -アミロイド (18-28)

本発明における  $\beta$ -アミロイドとしては、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する  $\beta$ -アミロイド (1-38)、配列番号：2 で表さ

れるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-39)、配列番号:3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-40)、配列番号:4で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-41)、配列番号:5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-42)または配列番号:6で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-43)などが用いられる。

本発明における $\beta$ -アミロイドの誘導体としては、上記 $\beta$ -アミロイドのN端部のアミノ酸がそれぞれ1ないし17残基程度欠落したもの、L-アスパラギン酸がL-イソアスパラギン酸、D-イソアスパラギン酸またはD-アスパラギン酸に異性化したもの、N端部にピログルタミン酸を有するものなどが用いられる。具体的には、配列番号:5で表されるアミノ酸配列の第2番目~42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号:5で表されるアミノ酸配列の第3番目~42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、配列番号:5で表されるアミノ酸配列の第4番目~42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号:1~配列番号:6で表されるアミノ酸配列から第1番目~16番目のアミノ酸配列または第1番目~17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチド(例えば、 $\beta$ -アミロイド(17-40)、 $\beta$ -アミロイド(18-40)など)などが用いられる。これらの $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物より自体公知の方法で調製することもできるし、また市販の天然精製標品であってもよい。

本発明における $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドとしては、例えば $\beta$ -アミロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドが挙げられる。

本発明における $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）としては、例えば $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（1-28）で表される $\beta$ -アミロイドのN端側の部分ペプチド）を認識しない抗体などが用いられる。より具体的には、これらの抗体の中でも、

(i) 配列番号：8および配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（25-35）および $\beta$ -アミロイド（35-43））を認識しない抗体、

(ii) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（25-35））を認識する抗体、より好ましくは配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（25-35））を認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（35-43））を認識しない抗体、

(iii) 配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（35-43））を認識する抗体、より好ましくは配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（25-35））を認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（35-43））を認識する抗体などが好ましい。

上記(i)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド（1-38）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド（1-39）および（または）配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド（1-40）を特に

認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-39)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-40)、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-42)を認識する抗体が好ましい。

また、上記(ii)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-39)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-40)および(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-42)を特に認識する抗体が好ましい。

さらに、上記(iii)の抗体の中でも、アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる $\beta$ -アミロイド(特に、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-42))を特に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-42)を認識するが、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-39)および配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド(1-40)を認識しない抗体が好ましい。

上記(i)の抗体の代表例としては、BA-27aで標示されるモノクローナル抗体があり、上記(ii)の抗体の代表例としては、BS-85aで標示されるモノクローナル抗体があり、上記(iii)の抗体の代表例としては、BC-05a、BC-15a、BC-65a、BC-75a、BC-55a(特に、BC-05aが好ましい)で標示されるモノクローナル抗体が好ましい。

ノクローナル抗体がある。

次に、本発明における $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（ $\beta$ -アミロイド（1-28））および（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（ $\beta$ -アミロイド（1-16））を認識するモノクローナル抗体が用いられ、具体的にはBAN-50a、BAN-052a、BAN-11a、BAN-30a、BAN-20a、BAN-40aで標示されるモノクローナル抗体などがあるが、特にBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体が特に好ましい。

さらに、本発明における $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の中心部の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）などが用いられる。これら抗体のなかでも、配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドを特に認識する抗体が好ましく、なかでも配列番号：3で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列（配列番号：11のアミノ酸配列）または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列（配列番号：12のアミノ酸配列）を有するペプチドを特に認識する抗体が好ましい。具体的には、BP-01a、BP-02a、BP-03aまたはBP-90aで標示されるモノクローナル抗体などが用いられる。これ



らモノクローナル抗体のうち、BP-03aおよびBP-90aは配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドをも認識することができる。これらモノクローナル抗体のなかでも、特にBP-90aが好適である。

以下に、抗原の調製方法およびモノクローナル抗体の作成方法について詳細に説明する。

#### (1) 抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体を加水分解して得られる部分ペプチド、 $\beta$ -アミロイドと同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単に $\beta$ -アミロイド抗原と称することもある）。

該 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体としては、前述したものが用いられる。これら $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製することもできるし、また市販の天然精製標品であってもよい。

該 $\beta$ -アミロイドを加水分解して得られる部分ペプチドとしては、例えば配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する $\beta$ -アミロイド（1-43）などをアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼなどのエキソプロテアーゼによりN末端および（または）C末端から順次加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物、あるいは $\beta$ -アミロイド（1-43）を種々のエンドペプチダーゼにより加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物などが用いられる。この方法で $\beta$ -アミロイド（1-42）を作製した場合、標品中に $\beta$ -アミロイ

ド(1-41)および(または)β-アミロイド(1-43)が混合している場合がある。

該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製したβ-アミロイド抗原と同一の構造を有するものや、β-アミロイド(1-43)などのアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチド(以下β-アミロイド関連合成ペプチドと略す)などが用いられる。

上記合成ペプチドは、公知の常套手段で製造することができ、固相合成法、液相合成法のいずれによっても製造することができる。具体的な、ペプチド合成の方法としては、例えばB. Merrifield [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ (J. Am. Chem. Soc.), 85, 2149 (1963)]、M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti [ペプチド シンセーシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York, 1966年]、SchroderおよびLubke [ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York, 1965年]、泉屋信夫他 [ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985年]、矢島治明および榊原俊平 [生化学実験講座1、タンパク質の化学IV, 205, 1977年]などが用いられる。例えば、固相法によりβ-アミロイドあるいはβ-アミロイド関連合成ペプチドを合成する場合には、不溶性樹脂として当該技術分野で知られたもの(例えば、クロロメチル樹脂、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂など)の何れかの樹脂を用い、β-アミロイドあるいはβ-アミロイド関連合成ペプチドのC末端側から保護アミノ酸を常法に従って順次縮合する。次いで、フッ化水素処理で全保護基を除去して、高速液体クロマトグラフィーなどのそれ自体公知の方法による精製後、目的とするβ-アミロイドあるいはβ-アミロイド関連合成ペプチドを得ることができる。

また、N-保護アミノ酸としては、 $\alpha$ -アミノ基はB o c基で保護し、さらに例えばセリンおよびスレオニンの水酸基はB z l基で保護し、グルタミン酸、アスパラギン酸の $\omega$ -カルボキシ基はO B z l基で保護し、リジンの $\epsilon$ -アミノ基はC l - Z基で保護し、チロシンの水酸基はB r - Z基で保護し、アルギニンのグアニド基はT o s基で保護し、ヒスチジンのイミダゾール基はB o m基で保護する方法で製造することができる。

本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

P A M	: フェニルアセタミドメチル
B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B z l	: ベンジル
O c H e x	: シクロヘキシルエステル
O B z l	: ベンジルエステル
T o s	: p-トルエンシルホニル
H O B t	: 1-ベンゾトリアゾール
M e B z l	: 4-メチルベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
G l y	: グリシン
A l a	: アラニン

V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン。

$\beta$ -アミロイド抗原は、凝集しやすいため、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、該 $\beta$ -アミロイド抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体および担体（キャリアー）と $\beta$ -アミロイド抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させた $\beta$ -アミロイド抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合

で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN, N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、SPDPなど）を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

## (2) モノクローナル抗体の作製

$\beta$ -アミロイド抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイント

アジュバントを投与してもよい。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウス、ラットなどが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、 $\beta$ -アミロイド抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗 $\beta$ -アミロイド抗体価の測定は、例えば後記の標識化 $\beta$ -アミロイドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髄腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髄細胞数との好ましい比率は、通常1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、通常20～40℃、好ましくは30～37℃で通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗 $\beta$ -アミロイド抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば $\beta$ -アミロイドあるいは $\beta$ -アミロイド関連合成ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、

マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した $\beta$ -アミロイドを加え、固相に結合した抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体の選別、育種は通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加して、10~20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地 (例、RPMI 1640) で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗 $\beta$ -アミロイド抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 [例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など] に従って行われる。

また、 $\beta$ -アミロイドの一部領域と反応する抗 $\beta$ -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマおよび、 $\beta$ -アミロイドとは反応するがその一部領域とは反応しない抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別はたとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

以上のようにして得られる 本発明の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体、

BAN-052aで標示されるモノクローナル抗体、 BAN-50aで標示されるモノクローナル抗体および  $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体は、それぞれ $\beta$ -アミロイドのN端側、C端側および中心部分の部分ペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体と、被検液および標識化 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

(2) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法であって、担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体であり、他方が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド

(1-28)）および（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド(1-16)）を



認識する抗体である定量法、

(3) 担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とし、担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体であり、他方が $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体または配列番号：7もしくは配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体である定量法を提供する。

より具体的には、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体がBA-27a、BS-85aまたはBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（1-28））および（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 $\beta$ -アミロイド（1-16））を認識する抗体がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体である。

上記の定量法（2）の中でも、特に

担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方がBA-27aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたは

BAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、

担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方がBS-85aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、あるいは

担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方がBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドが配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法が好適である。

上記の定量法（3）の中でも、特に

担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、および（または）配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、あるいは

担体上に不溶化した $\beta$ -アミロイドに対する抗体および標識化された $\beta$ -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBA-27a、BS-85aまたはBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである定量法が好適である。

以下に本発明の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体（以下、 $\beta$ -アミロイドと略称する）の定量法（免疫測定法）について、より詳細に説明する。

本発明の抗体は $\beta$ -アミロイドを認識することができるので、 $\beta$ -アミロイドの測定あるいは組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'あるいはF a b画分などを用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、 $\beta$ -アミロイド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法、サンドイッチ法などが好適に用いられるが、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>Cなどが、上記酵素としては、安

定で比活性の大きなものが好ましく、例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが、蛍光物質としては、例えばフルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは $\beta$ -アミロイドと標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

サンドイッチ法においては、不溶化した抗 $\beta$ -アミロイド抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗 $\beta$ -アミロイド抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の $\beta$ -アミロイド量を定量することができる。1次反応と2次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による $\beta$ -アミロイドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗 $\beta$ -アミロイド抗体とは $\beta$ -アミロイドの該抗体と結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、例えば1次反応で用いられる抗体が $\beta$ -アミロイドのN端側の

部分ペプチドを認識する場合は、2次反応で用いられる抗体は、好ましくはN端側の部分ペプチド以外（すなわち、C端側の部分ペプチド）を認識する抗体が用いられる。

具体的に、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、 $\beta$ -アミロイド（1-40）を免疫原として作製したモノクローナル抗体のうち、 $\beta$ -アミロイド（1-28）と交差反応しない抗体が好適に用いられる。本発明者らは、このような抗体を産生するハイブリドーマを2種類確立した。これらのハイブリドーマが産生する抗体は、後述する $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化 $\beta$ -アミロイド（1-40）を用いる競合法の酵素免疫測定法において、 $\beta$ -アミロイド（1-28）と交差反応しなかったが、 $\beta$ -アミロイド（1-40）と反応した（B/B<sub>0</sub> = 0.5を与える抗原濃度：200～250 nM、40～50 ng/well）。さらに、後述する $\beta$ -アミロイド（1-16）を免疫原として作製した $\beta$ -アミロイドのN端側の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体のうち、特にBAN-50aまたはBAN-052aと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、予想外にも $\beta$ -アミロイドをより高感度に測定できることが明らかとなった（検出感度、0.2 pg/well）。すなわち、本発明のサンドイッチ法酵素免疫測定法に適した $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体の1種類として、 $\beta$ -アミロイド（1-40）に反応し、 $\beta$ -アミロイド（1-28）と交差反応しないモノクローナル抗体が好適に用いられるが、それらの抗体は必ずしも $\beta$ -アミロイド（1-40）に対して高親和性である必要はない。このような抗体として、例えば、BA-27aなどが好都合に用いられる。

また、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる $\beta$ -アミロイド

のC端側の部分ペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体としては、 $\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを5種類確立した。これらの抗体は、後述する $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)を用いる競合法の酵素免疫測定法において、 $\beta$ -アミロイド(25-35)と反応し( $B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 20 nM、1 ng/well)、 $\beta$ -アミロイド(1-40)とも反応した( $B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 800 nM、160 ng/well)。さらに、上述したBAN-50aまたはBAN-052aと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、予想外にも $\beta$ -アミロイドをより高感度に測定できることが明らかになった(検出感度、3 pg/well)。すなわち、本発明のサンドイッチ法酵素免疫測定法においては、 $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体として、 $\beta$ -アミロイド(25-35)に対するモノクローナル抗体が好適に用いられるが、これらの抗体は必ずしも $\beta$ -アミロイド(1-40)に高親和性である必要はない。このような抗体として、例えば、BS-85aが好都合に用いられる。

なお、BS-85aとBAN-50aあるいはBAN-052aとを組み合わせたサンドイッチ法、あるいはBA-27aとBAN-50aあるいはBAN-052aとを組み合わせたサンドイッチ法において、 $\beta$ -アミロイド(1-28)との交差反応性は認められなかった。

さらに、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、 $\beta$ -アミロイド(35-43)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを18種作製した。なかでも4種類の抗体は、後述するパーオキシダ

ーゼ標識化 $\beta$ -アミロイド(35-43)を用いる競合法の酵素免疫測定法において、森らの方法(ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、267巻、17082-17086ページ、1988年)によりアルツハイマー病患者脳から抽出した $\beta$ -アミロイド画分(ギ酸抽出物)に対して高い反応性を示す一方、合成ペプチドである $\beta$ -アミロイド(1-40)とは反応性を示さなかった。これらの抗体をBAN-50aと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、上述したアルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中の $\beta$ -アミロイドを高感度に検出し、 $\beta$ -アミロイド(1-40)については全く検出しないことが明かとなった。なお、用いたアルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中の $\beta$ -アミロイドは、質量分析から $\beta$ -アミロイド(1-42)が主要な構成成分であることがわかっており、さらにN端部にピログルタミン酸を有する $\beta$ -アミロイド(3-42)や、 $\beta$ -アミロイド(2-42)、 $\beta$ -アミロイド(4-42)をはじめとするN端部が順次欠落した分子種を含むことが明らかにされた。

一方、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる $\beta$ -アミロイドのN端側の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、 $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを8種類作製した。これらの抗体の $\beta$ -アミロイド(1-40)に対する反応性を後述するパーオキシダーゼ標識化 $\beta$ -アミロイド(1-16)を用いる競合法により調べたところ、4種類の抗体が $\beta$ -アミロイド(1-40)に良好な反応性を有していた( $B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 25~70 nM、5~15 ng/well)。さらに、これらの抗体をサンドイッチ法に適用した場合、これら抗体の間で予想外にも大きな感度の差が認められた。すなわち、モノクローナル抗体BAN-052aが他の

3種類（BAN-11a、BAN-20a、BAN-30a）の抗体と比較して群を抜いて高感度のサンドイッチ測定法を与えることが明らかとなった。そこで、サンドイッチ法にさらに適した抗 $\beta$ -アミロイド（1-16）モノクローナル抗体を選択すべく新たに16種類の抗体を作製した。パーオキシダーゼ標識化 $\beta$ -アミロイド（1-16）を用いる競合法により調べたところ、これらの抗体のうち10種類の抗体が $\beta$ -アミロイド（1-40）に良好な反応性を有していたが、そのなかでも特にBAN-50aが極めて高感度のサンドイッチ測定法を与えることが明らかとなった。すなわち、本発明において、サンドイッチ法に適した $\beta$ -アミロイドのN端側の部分ペプチドを認識する抗体として、 $\beta$ -アミロイド（1-16）に対する抗体を数種類提供するが、特にBAN-50aおよびBAN-052aが好適に用いられる。

さらに、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる $\beta$ -アミロイドの中心部分の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、配列番号：12で表される $\beta$ -アミロイド（18-28）を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを9種類作製した。なかでも、BP-01、BP-02、BP-03、BP-90の4つのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体BP-01a、BP-02a、BP-03a、BP-90aが好適であり、BP-03aおよびBP-90aは配列番号：11で表される $\beta$ -アミロイド（17-28）をも認識することができる。これらモノクローナル抗体のなかでも、特にBP-90aが好適である。

本発明のモノクローナル抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどにも用いることもができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対



して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B／F分離）、BおよびFいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B／F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法や、第1抗体として固相化抗体を用いるかあるいは第1抗体は可溶性のものを用い、第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法などが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてβ-アミロイドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編

「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。したがって、本発明のサンドイッチ免疫測定法により $\beta$ -アミロイドの測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。

以上のように、本発明の抗体は、 $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体を感度良く定量することができるので、アルツハイマー病の診断剤等として有用である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、 $\beta$ -アミロイド(1-40)を免疫したマウスの抗体価を $\beta$ -Gal標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)を用いて調べた結果を示す。

第2図は、 $\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫したマウスの抗体価を $\beta$ -Gal標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)を用いて調べた結果を示す。

第3図は、 $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫したマウスの抗体価をHRP標識化 $\beta$ -アミロイド(1-16)を用いて調べた結果を示す。

第4図は、 $\beta$ -アミロイド(35-43)を免疫したマウスの抗体価をHRP標識化 $\beta$ -アミロイド(35-43)を用いて調べた結果を示す。

す。

第5図は、細胞融合後のハイブリドーマのスクリーニングの典型例を示す。(a)は $\beta$ -アミロイド(1-40)を免疫したマウスを用いた場合、(b)は $\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫したマウスを用いた場合、(c)は $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫したマウスを用いた場合、および(d)は $\beta$ -アミロイド(35-43)を免疫したマウスを用いた場合である。

第6図は、 $\beta$ -アミロイド(1-40)を免疫原として作製したモノクローナル抗体BA-27aの $\beta$ -アミロイド(1-40)(-●-)、 $\beta$ -アミロイド(1-28)(-△-)、 $\beta$ -アミロイド(1-16)(-○-)、 $\beta$ -アミロイド(25-35)(-□-)、および $\beta$ -アミロイド(35-43)(-▲-)に対する反応性を $\beta$ -Ga1標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

同様に、第6図(b)は $\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫原として作製したモノクローナル抗体BS-85aの反応性を $\beta$ -Ga1標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

第7図(a)および(b)は、それぞれ $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫原として作製したモノクローナル抗体BAN-052aおよびBAN-50aの $\beta$ -アミロイド(1-40)(-□-)、 $\beta$ -アミロイド(1-28)(-△-)、および $\beta$ -アミロイド(1-16)(-○-)に対する反応性をHRP標識化 $\beta$ -アミロイド(1-16)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

第8図は、BAN-052a(-●-)、BAN-11a(-○-)、BAN-20a(-△-)、BAN-30a(-□-)およびBAN-50a(-■-)の $\beta$ -アミロイド(1-40)に対する反応性をHR

P 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-16) を用いる競合法-EIA で調べた結果を示す。

第9図は酵素標識抗体としてBS-85a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●—)、BAN-11a (—▼—)、BAN-20a (—▲—) またはBAN-30a (—■—) を用いたサンドイッチ-EIA の  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第10図は、酵素標識抗体としてBA-27a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●—)、BAN-11a (—▼—)、BAN-20a (—▲—) またはBAN-30a (—■—) を用いたサンドイッチ-EIA の  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第11図は、酵素標識抗体としてBAN-052a-HRPを用い、固相用抗体としてBA-27a (—●—) またはBS-85a (—○—) を用いたサンドイッチ-EIA の  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第12図は、酵素標識抗体としてBAN-052a-HRP (—○—) あるいはBA-27a-HRP (—□—) を用い、固相用抗体としてBAN-052aを用いたサンドイッチ-EIA の  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第13図は、酵素標識抗体としてBS-85a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●, ○—) あるいはBAN-50a (—▲, △—) を用いたサンドイッチ-EIA の  $\beta$ -アミロイド (1-40) (—●, ▲—) あるいは  $\beta$ -アミロイド (1-28) (—○, △—) の標準曲線を示す。

第14図は、酵素標識抗体としてBA-27a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●, ○—) あるいはBAN-50a (—▲, △—) を用いたサンドイッチ-EIA の  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

0) (—●, ▲—) あるいは $\beta$ -アミロイド (1-28) (—○、△—) の標準曲線を示す。

第15図は、酵素標識抗体として (a) BS-85a-HRP (b) BA-27a-HRP、あるいは (c) BC-05a-HRP を用い、固相用抗体として BAN-50a を用いたサンドイッチ法-EIA の、 $\beta$ -アミロイド (1-38) (—○—)、 $\beta$ -アミロイド (1-39) (—△—)、 $\beta$ -アミロイド (1-40) (—■—)、 $\beta$ -アミロイド (1-42) (—●—)、あるいは $\beta$ -アミロイド (1-28) (—□—) の標準曲線を示す。

第16図は、アルツハイマー病患者脳脊髄液中の $\beta$ -アミロイドの逆相-HPLCによる溶出画分の免疫活性を、酵素標識抗体として (a) BS-85a-HRP、(b) BA-27a-HRP を用い、固相用抗体として BAN-50a を用いるサンドイッチ-EIA によって調べた結果を示す。

第17図は、アルツハイマー病患者由来 $\beta$ -アミロイド画分 (ギ酸抽出物) をゲル濾過により部分精製したのち、逆相HPLCにより分画した結果を示す (検出波長 = 210 nm)。

第18図は、アルツハイマー病患者脳由来 $\beta$ -アミロイド画分 (蟻酸抽出物) の図17の逆相-HPLCの溶出画分の (a) No. 35、(b) No. 41 および (c) No. 43 の質量分析スペクトルを示す。

第19図は、アルツハイマー病患者脳由来 $\beta$ -アミロイド画分 (蟻酸抽出物) の図17の逆相-HPLC溶出画分について、酵素標識抗体として、(a) BS-85a-HRP、(b) BA-27a-HRP および (c) BC-05a-HRP を用い、固相用抗体として BAN-50a を用いたサンドイッチ-EIA によって定量した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

## 実施例

### 〔実施例 1〕 抗原の作成

#### (1) $\beta$ -アミロイド (1-40) の製造

市販の Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂 (アプライド バイオシステムズ社製) 0.71 g (0.5 ミリモル) を用い、ペプチド合成機 (アプライド バイオシステムズ社製モデル 430A) を使用し合成した。樹脂上の Boc 基を 50% トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理しアミノ基を遊離させた後、このアミノ基に各 2 ミリモルの Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Met, Boc-Leu, Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Lys (Cl-Z), Boc-Asn, Boc-Asp (OCH<sub>2</sub>Hex), Boc-Glu (OCH<sub>2</sub>Hex), Boc-Phe, Boc-Gln, Boc-His (Bom), Boc-Tyr (Br-Z), Boc-Ser (Bzl), Boc-Arg (Tos) を  $\beta$ -アミロイド (1-40) のアミノ酸配列通りに HOBt/DCC で活性化して縮合し、保護  $\beta$ -アミロイド (1-40)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂 2.70 g を得た。この保護  $\beta$ -アミロイド (1-40)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂 0.56 g を p-クレゾール共存下無水弗化水素 10 ml で 0℃、60 分間処理した後、弗化水素を減圧留去し残渣をエーテル 10 ml で 2 回洗浄した。これを 50%-酢酸水で抽出し、不溶物を濾去し 50%-酢酸水で洗浄した。濾液、洗浄液を合わせ、2~3 ml に減圧濃縮し、50%-酢酸水で充填したセファデックス G-25 のカラム (2.0×85 cm) に付し、同溶媒で展開した。主要画分を集め凍結乾燥し黄白色の粉末約 150 mg を得た。これを 20%-アセトニトリル水 (0.1% トリフルオロ酢酸含有) 50 ml に溶解し、同溶媒で充填した LiChroprep RP-18 カラム (4.1×10 cm) に付し、20%~70% までのアセトニトリル水溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸含有) の直線型濃度勾配溶出した。主要画分を集め再度 LiChroprep RP-18 カラム (2.6×6 cm) に付し、0%~50% までのアセトニトリル水溶液

(0.1%トリフルオロ酢酸含有)の直線型濃度勾配溶出、主要画分を集め凍結乾燥し白色粉末10mgを得た。

アミノ酸分析値:

Gly 6.85(6), Ala 3.44(3), Val 5.68(6), Leu 2.00(2), Ile 1.39(2),  
Met 0.89(1), Phe 3.21(3), Ser 1.89(2), Asp 4.35(4), Glu 4.52(4),  
Lys 2.05(2), His 2.86(3), Arg 1.10(1), Tyr 0.97(1)

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 4328.05

HPLC溶出時間 22.8分

カラム条件

カラム: Wakosil-5C18 HG (4.6×100mm)

溶離液: A液 (0.1%トリフルオロ酢酸水溶液)

B液 (0.1%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用いA液からB液へ直線型濃度勾配溶質 (50分)

流速: 1.0 ml/分。

## (2) [Cys<sup>17</sup>] β-アミロイド (1-16) の製造

市販のBoc-Cys(MeBzl)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂(アプライド バイオシステムズ社製) 0.75g (0.5ミリモル)を用い、ペプチド合成機(アプライド バイオシステムズ社製モデル430A)を使用し合成した。樹脂上のBoc基を50%トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理しアミノ基を遊離させた後、このアミノ基に各2ミリモルのBoc-Lys(Cl-Z), Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Val, Boc-Glu(OcHex), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asp(OcHex), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe を[Cys<sup>17</sup>] β-アミロイド (1-16) のアミノ酸配列通りにHOBt/DCCで活性化して縮合し、保護 [Cys<sup>17</sup>] β-アミロイド (1-16) (MeBzl)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂1.90gを得た。この保護 [Cys<sup>17</sup>] β-アミロイド (1-16) (MeBzl)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂0.68gをp-クレゾール共存下無

水弗化水素 10 ml で 0℃、60 分間処理した後、弗化水素を減圧留去し残渣をエーテル 10 ml で 2 回洗浄した。これを 50%-酢酸水で抽出し、不溶物を濾去し 50%-酢酸水で洗浄した。濾液、洗浄液を合わせ、1~2 ml に減圧濃縮し、50%-酢酸水で充填したセファデックス G-25 (2.0×85cm) のカラムに付し、同溶媒で展開した。主要画分を集め凍結乾燥し、白色の粉末 136.7 mg を得た。

アミノ酸分析値:

Asp 2.17(2), Ser 0.96(1), Glu 3.04(3), Gly 1.00(1), Ala 1.00(1),  
Cys 0.82(1), Val 0.99(1), Tyr 0.94(1), Phe 1.09(1), Lys 1.05(1),  
His 2.89(3), Arg 0.97(1)

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2056.83

HPLC 溶出時間 14.8 分

カラム条件

カラム: Wakosil-5C18 HG (4.6×100mm)

溶離液: A 液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水溶液)

B 液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用い A 液から B 液へ直線型濃度勾配溶質 (50 分)

流速: 1.0 ml/分。

### (3) β-アミロイド (25-35) の製造

市販の Boc-Met-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (アプライド バイオシステムズ社製) 0.66 g (0.5 ミリモル) を用い、ペプチド合成機 (アプライド バイオシステムズ社製モデル 430A) を使用し合成した。樹脂上の Boc 基を 50% トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理しアミノ基を遊離させた後、このアミノ基に各 2 ミリモルの Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Asn, Boc-Ser(Bzl) を β-アミロイド (25-35) のアミノ酸配列通りに HOBt/DCC で活性化し縮合し、保護 β-アミロイド



(25-35)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂 1.14 gを得た。この保護β-アミロイド (25-35)-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂 0.61 gをp-クレゾール共存下無水弗化水素 10 mlで0℃、60分間処理した後、弗化水素を減圧留去し残渣をエーテル 10 mlで2回洗浄した。これを50%-酢酸水で抽出し、不溶物を濾去し50%-酢酸水で洗浄した。濾液、洗浄液を合わせ、2~3 mlに減圧濃縮し0.1%トリフルオロ酢酸水 50 mlで希釈した後、0.1%トリフルオロ酢酸水で充填したLiChroprep RP-18カラム (2.6×10cm) に付し、0%~50%までのアセトニトリル水溶液 (0.1%トリフルオロ酢酸含有) の直線型濃度勾配溶出した。主要画分を集め凍結乾燥し白色の粉末 100 mgを得た。これをN-酢酸 0.5 mlに溶解し、同溶媒で充填したセファデックス LH-20 (1.0×96cm) に付し同溶媒で展開した。主要画分を集め凍結乾燥し白色粉末 91 mgを得た。

アミノ酸分析値:

Asp 0.97(1), Ser 0.95(1), Gly 2.94(3), Ala 1.00(1), Met 0.89(1),  
Ile 1.59(2), Leu 1.00(1). Lys 0.97(1)

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2056.83

HPLC溶出時間 18.9 分

カラム条件

カラム: Wakosil-5C18 HG (4.6×100 mm)

溶離液: A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水溶液)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)  
を用いA液からB液へ直線型濃度勾配溶質 (50分)

流速: 1.0 ml/分。

(4) [Cys<sup>34</sup>] β-アミロイド (35-43) の製造

Fmoc-Thr(tBu)-ワン樹脂 (0.46 g = 0.25 ミリモル、渡辺化学

社製)を出発原料として、アプライド・バイオシステムズ社のFmoc-アミノ酸誘導体カートリッジ(1.0ミリモル)を用い、20%ピペリジン-DMF溶液によるFmoc基の脱保護後、DCC-HOBt法にて順次C末端側からペプチド鎖を延長する。このようにして、次式で表される保護ペプチド樹脂0.73gを得る。

Fmoc-Cys(Trt)-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr(tBu)-ワン樹脂

このペプチド樹脂のうち0.58g(0.20ミリモル)を氷冷下フェノール0.75g、ブタンジチオール0.25ml、チオアニソール0.5ml、脱イオン水0.5ml、トリフルオロ酢酸10mlを加え、室温で1.5時間攪拌した。樹脂を濾去し、濾液を濃縮し、残渣に氷冷下エーテルを加えて、沈澱として濾取し、十分にエーテルで洗浄した後、乾燥し白色粉末を得た。

収量 168mg (89%)

質量分析による(M+H)<sup>+</sup>=949.5 (理論値=949.5)。

(5)  $\beta$ -アミロイド(1-38)および $\beta$ -アミロイド(1-39)の作製

$\beta$ -アミロイド(1-40)をカルボキシペプチダーゼ Y で限定分解することにより $\beta$ -アミロイド(1-38)および $\beta$ -アミロイド(1-39)を作製した。すなわち、 $\beta$ -アミロイド(1-40)(Bachem社製)50 $\mu$ gとカルボキシペプチダーゼ Y (オリエンタル酵母社製)0.5 $\mu$ gを0.5%酢酸アンモニウム水溶液に溶解して60 $\mu$ lとし、10℃で2時間反応させた。反応後、Vydac C4(The Sep/a/rations Group社製)を用いる逆相-HPLCにより分画し、UV(210nm)で検出された3本の主なピークを質量分析により同定した。

## カラム条件

カラム：V y d a c C 4

(The Sep/a/rations Group社製、 $4.6 \times 250$ mm)

溶離液：A液 (0.1% トリフルオロ酢酸含有 5% アセトニトリル)

B液 (0.1% トリフルオロ酢酸含有 80% アセトニトリル)

溶出方法：溶離液Bの濃度を最初の5分間は30%に維持、次に60分間かけて30-50%に直線的に上昇させた。

流 速：0.5 ml/分

質量分析による(M+H)<sup>+</sup>=4132.9： $\beta$ -アミロイド(1-38)

(理論値 4132.6)

4231.6： $\beta$ -アミロイド(1-39)

(理論値 4231.8)

4330.9： $\beta$ -アミロイド(1-40)

(理論値 4330.9)。

## 〔実施例2〕免疫原の作製

(1)  $\beta$ -アミロイド(1-40)を含む免疫原の作製

上記実施例1(1)で得られた $\beta$ -アミロイド(1-40)と牛チログロブリン(BTG)との複合体を作製し免疫原とした。すなわち、 $\beta$ -アミロイド(1-40) 0.6mgを15%のDMFを含む3mMリン酸緩衝液、pH6.5、1.1mlに溶解させたのち、0.5mlの水に溶解させたBTG 2.5mgを加え、さらに終濃度0.3%のグルタルアルデヒドを加えて室温で3時間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で2日間透析した。

(2)  $\beta$ -アミロイド(25-35)を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (3) で得られた  $\beta$ -アミロイド (25-35) と BTG との複合体を作製し免疫原とした。すなわち、 $\beta$ -アミロイド (25-35) 0.5 mg と BTG 2.5 mg とを、pH 4.5 に調節した水 1 ml に溶解させ、終濃度 0.4% のグルタルアルデヒドを加えて室温で 3 時間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(3)  $\beta$ -アミロイド (1-16) を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (2) で得られた [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -アミロイド (1-16) と BTG との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、BTG 20 mg を、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.9) 1.4 ml に溶解させ、N-( $\gamma$ -マレイミドブチロキシ) サクシニミド (GMB S) 2.2 mg (8  $\mu$ mol) を含む DMF 溶液 100  $\mu$ l と混合し、室温で 40 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BTG 15 mg と [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -アミロイド (1-16) 3.6 mg とを混合し、4℃で 2 日間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(4)  $\beta$ -アミロイド (35-43) を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (4) で得られた [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -アミロイド (35-43) と牛血清アルブミン (BSA) との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、BSA 21 mg (0.31  $\mu$ mol) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 1.4 ml に溶解させ、GMB S 3.5 mg (12.5  $\mu$ mol) を含む DMF 溶液 100  $\mu$ l と混合し、室温で 35 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BSA 4.5 mg と [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -アミロイド (35-43) 2.1 mg とを混合し、4℃で一晩反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(5)  $\beta$ -アミロイド (18-28) を含む免疫原の作製

[Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -アミロイド (18-28) と BTG との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、BTG 21 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.9) 1.5 ml に溶解させ、GMBS 2.4 mg (8.4  $\mu$ mol) を含む DMF 溶液 100  $\mu$ l と混合し、室温で 40 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BTG 約 7 mg と [Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -アミロイド (18-28) (アコード社製) 2.0 mg とを混合し、4℃で一晩反応させた。反応後、生理食塩水に対し 4℃で 3 日間透析した。

〔実施例 3〕免疫

6～8 週令の BALB/C 雌マウスに上記実施例 2 記載の免疫原  $\beta$ -アミロイド (1-40) - BTG 複合体、 $\beta$ -アミロイド (25-35) - BTG 複合体、 $\beta$ -アミロイド (1-16) - BTG 複合体、 $\beta$ -アミロイド (35-43) - BSA 複合体あるいは  $\beta$ -アミロイド (18-28) - BTG 複合体を、それぞれ約 80  $\mu$ g/匹を完全フロイントアジュバントとともに皮下免疫した。以後 3 週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに 2～3 回追加免疫した。

〔実施例 4〕酵素標識化抗原の作製

(1)  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-40) の作製

$\beta$ -アミロイド (1-40) 70  $\mu$ g (16 nmol) を 40  $\mu$ l の DMSO に溶解させ、トリエチルアミン 160 nmol (10  $\mu$ l DMF 溶液) と N-スクシニミジル-3-(2-ピリミジルジチオ) プロピオネート (SPDP) 23 nmol (7  $\mu$ l DMSO 溶液) とを加えた後、室温で 90 分反応させた。反応液の全量を  $\beta$ -Gal (酵素免疫測定法用、ベーリンガーマンハイム社製) 1.7 mg (3.3 nmol)

の溶液 (0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.5、0.45 ml に溶解) に加え、4℃で1日反応させた。反応後、ウルトロゲル AcA34 カラム (LKB-ファルマシア社製) で分画し、 $\beta$ -Gal 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-40) を得た。

(2) 西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-16) の作製

上記実施例 1 (2) で得られた [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -アミロイド (1-16) と HRP (酵素免疫測定法用、ベーリンガー・マンハイム社製) とを架橋し、酵素免疫測定法 (EIA) の標識体とした。すなわち、HRP 5 mg (125 nmol) を 0.95 ml の 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.8 に溶解させ、GMBS 3.6 mg (1.3  $\mu$ mol) を含む DMF 溶液 50  $\mu$ l と混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックス G-25 カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入された HRP 3.3 mg (78 nmol) と実施例 1 (2) で作製された [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -アミロイド (1-16) 0.56 mg (270 nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲル AcA44 (LKB-ファルマシア社製) カラムで分画し、HRP 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-16) を得た。

(3) HRP 標識化  $\beta$ -アミロイド (35-43) の作製

上記実施例 1 (4) で得られた [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -アミロイド (35-43) と HRP とを架橋し、EIA の標識体とした。すなわち、HRP 12 mg (310 nmol) を 1.4 ml の 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.8 に溶解させ、GMBS 1.3 mg (4.5  $\mu$ mol) を含む DMF 溶液 100  $\mu$ l と混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックス G-25 カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入された HRP 3.2 mg (76 nmol) と実施例 1 (4) で作

製された[Cys<sup>34</sup>] $\beta$ -アミロイド(35-43) 2.1mg (7.2 $\mu$ mol)とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲルAcA 44カラムで分画し、HRP標識化 $\beta$ -アミロイド(35-43)を得た。

#### (4) HRP標識化 $\beta$ -アミロイド(18-28)の作製

[Cys<sup>29</sup>] $\beta$ -アミロイド(18-28)とHRPとを架橋し、EIAの標識体とした。すなわち、HRP 16mg (390nmol)を1.4mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.8)に溶解させ、GMB S 1.1mg (3.9 $\mu$ mol)を含むDMF溶液100 $\mu$ lと混合し室温で40分間反応させたのち、セファデックスG-25カラムで分画した。このようにして作製したマレイミド基の導入されたHRP 6.0mg (150nmol)と[Cys<sup>29</sup>] $\beta$ -アミロイド(18-28) 2.5mg (1.9 $\mu$ mol)とを混合し、4℃で2日間反応させた。反応後ウルトロゲルAcA 44カラムで分画し、HRP標識化 $\beta$ -アミロイド(18-28)を得た。

#### 〔実施例5〕抗体価の測定

(1)  $\beta$ -アミロイド(1-40)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

$\beta$ -アミロイド(1-40)を免疫中のマウス抗血清中の抗体価を以下の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず抗マウスイムノグロブリン抗体(IgG画分、カッペル社製)を100 $\mu$ g/ml含む0.1M炭酸緩衝液、pH 9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100 $\mu$ lずつ分注し、4℃で24時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH 7.4)で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため25%ブロッカー(雪印乳業社製)を含むPBSを300 $\mu$ lずつ分注し、4℃で少なくとも24時間処理した。

上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファA [0.1% BSA、0.1M NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% CHAPS [3-[(コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸] および0.1% NaN<sub>3</sub>を含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0] 50 $\mu$ l、バッファAで希釈したマウス抗 $\beta$ -アミロイド(25-35)抗血清100 $\mu$ lを加え4 $^{\circ}$ Cで16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記実施例4(1)で作製した $\beta$ -Gal標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)

(バッファAで200倍希釈) 100 $\mu$ lを加え室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性を4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトシド(4-MUG)を用いて測定するため、20 $\mu$ g/mlの4-MUGのバッファA(ただしCHAPSを含まない)溶液100 $\mu$ lを加え37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。反応を0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 $\mu$ l加えることにより停止させたのち、遊離した4-メチルウンベリフェロンを蛍光プレートリーダー(フルオロスキャンII、ラボシステム社製)を用い、励起波長355nm、測定波長460nmで測定した。結果を[第1図]に示す。免疫した8匹のマウスのうち4匹に比較的高い抗体価が認められた。

(2)  $\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

$\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫中のマウス抗血清中の抗体価を同様の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファA 50 $\mu$ l、バッファAで希釈したマウス抗 $\beta$ -アミロイド(25-35)抗血清50 $\mu$ l、および上記実施例4(1)で作製した $\beta$ -Gal標識化 $\beta$ -アミロイド(1-40)(バッファAで100倍希釈) 50 $\mu$ lを加え4 $^{\circ}$ Cで16時間反



応させた。次に、該プレートにPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性を4-MUGを用いて同様に測定した。結果を〔第2図〕に示す。免疫した8匹のマウスのうち5匹に比較的高い抗体価が認められた。

### (3) $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

マウス抗血清中の抗体価を以下の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファーC〔1%BSA、0.4M NaCl、および2mM EDTAを含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0〕50 $\mu$ l、バッファーCで希釈したマウス抗 $\beta$ -アミロイド(1-16)抗血清50 $\mu$ l、および上記実施例4(2)で作製したHRP標識化 $\beta$ -アミロイド(1-16)(バッファーCで2000倍希釈)を加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム(KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い)100 $\mu$ lを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100 $\mu$ lを加え停止させたのち、450nmの吸収をプレートリーダー(MTP-32、コロナ社製)で測定した。結果を〔第3図〕に示す。免疫した7匹のマウス全てに $\beta$ -アミロイド(1-16)に対する抗体価の上昇が認められた。

### (4) $\beta$ -アミロイド(35-43)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

上記実施例5(3)記載の方法に従って、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート、マウス抗 $\beta$ -アミロイド(35-43)抗血清、および上記実施例4(3)で作製したHRP標識化 $\beta$ -アミロイド(35-43)を反応させることにより、マウス抗血清中の抗体価を測定した。結果を〔第4図〕に示す。免疫したマウス9匹のうち3匹に

比較的高い抗体価が認められた。

(5)  $\beta$ -アミロイド(18-28)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

上記実施例5(3)記載の方法に従って、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート、マウス抗 $\beta$ -アミロイド(18-28)抗血清、および上記実施例4(4)で作製したHRP標識化 $\beta$ -アミロイド(18-28)を反応させることにより、マウス抗血清中の抗体価を測定した。免疫した7匹のマウスのうち4匹に比較的高い抗体価が認められた。

#### 〔実施例6〕モノクローナル抗 $\beta$ -アミロイド抗体の作製

比較的高い抗体価を示したマウスに対して200～300 $\mu$ gの免疫原を生理食塩水0.25～0.3mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫3～4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメデイウム(MEM)に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P3-X63.Ag8.U1(P3U1)を用いた〔カレントトピックス イン マイクロバイオロジー アンド イムノロジー、81、1(1978)〕。細胞融合は、原法〔ネイチャー、256、495(1975)〕に準じて行なった。すなわち、脾臓細胞およびP3U1をそれぞれ血清を含有しないMEMで3度洗浄し、脾臓細胞とP3U1数の比率を5:1になるよう混合して、800回転で15分間遠心を行なって細胞を沈澱させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%ポリエチレングリコール(PEG)6000(コッホライト社製)を0.3ml加え、37℃温水槽中で7分間静置して融合を行なった。融合後細胞に毎分2mlの割合でMEMを添加し、合計15mlのMEMを加えた後600

回転15分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するGITメデイウム（和光純薬）（GIT-10% FCS）にP3U1が1ml当たり $2 \times 10^5$ 個になるように浮遊し、24穴マルチディッシュ（リンプロ社製）に1ウェル1mlずつ120ウェルに播種した。播種後、細胞を37℃で5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。24時間後HAT（ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4}$ M、アミノプテリン $4 \times 10^{-7}$ M、チミジン $1.6 \times 10^{-3}$ M）を含んだGIT-10% FCS培地（HAT培地）を1ウェル当たり1mlずつ添加することにより、HAT選択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3、6、9日後に旧液を1ml捨てたあと、1mlのHAT培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき（約 $1 \times 10^6$ セル/ml）、上清を採取し、実施例5に記載の方法に従って抗体価を測定した。

$\beta$ -アミロイド（1-40）を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.1（第1図参照）を用いて得られた結果を〔第5図(a)〕に示した。これらも含め計2種類のハイブリドーマを選択した〔第1表〕。

第 1 表

抗 $\beta$ -アミロイド (25-35)および(1-40)モノクローナル抗体の反応特異性

反 応 性 1)					
ハイブリドマ株 No.	免疫原	$\beta A(1-40)$	$\beta A(1-28)$	$\beta A(25-35)$	備考
1	$\beta A(1-40)$	±	—	—	BA-27
2	"	±	—	—	
3	$\beta A(25-35)$	±	—	+	
4	"	±	—	+	
5	"	±	—	+	BS-85
6	"	±	—	+	
7	"	±	—	+	

1) 100 nMの抗原[ $\beta A(1-40)$ 、 $\beta A(1-28)$ 、 $\beta A(25-35)$ ]が存在した時+ :  $(B/B_0) < 0.50$ ± :  $0.50 \leq (B/B_0) < 0.90$ — :  $0.90 \leq (B/B_0)$ ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合した $\beta$ -Gal標識化 $\beta A(1-40)$ 量 $B_0$  : 抗原非存在時の抗体に結合した $\beta$ -Gal標識化 $\beta A(1-40)$ 量

$\beta$ -アミロイド(25-35)を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.8(第2図参照)を用いて得られた結果を〔第5図(b)〕に示した。これらも含め計5種類のハイブリドーマを選択した〔表1〕。

$\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例としてマウスNo.5(第3図参照)を用いて得られた結果を〔第5図(c)〕に示した。これらも含め当初ハイブリドーマ8株を選択し、さらにその後ハイブリドーマ16株を新たに選択した〔第2表〕。

$\beta$ -アミロイド(35-43)を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.4(第4図参照)を用いて得られた結果を〔第5図(d)〕に示した。これらを含め計18種類のハイブリドーマを選択した〔第3表〕。さらに、 $\beta$ -アミロイド(18-28)を免疫したマウス由来のハイブリドーマをスクリーニングし、計9種類のハイブリドーマを選択した〔第4表〕。

## 第 2 表

抗 $\beta$ -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体の反応性

反 応 性 1)				
ハイブリドマ株 No.	$\beta$ A(1-40)	$\beta$ A(1-28)	$\beta$ A(1-16)	備考
1	+	+	+	BAN-052
2	+	+	+	BAN-11
3	+	+	+	BAN-30
4	±	—	+	
5	±	±	+	
6	+	+	+	BAN-20
7	—	—	+	
8	—	—	+	
9	+	—	+	BAN-40
10	+	+	+	
11	+	+	+	
12	+	+	+	BAN-50
13	+	±	+	
15	+	+	+	
16	±	±	+	
17	+	+	+	
18	+	+	+	
19	+	+	+	
20	±	—	+	
21	—	—	+	
22	+	+	+	
23	±	±	+	
24	±	—	+	

1) 100 nMの抗原[ $\beta$ A(1-40)、 $\beta$ A(1-28)、 $\beta$ A(1-16)]が存在した時

＋ :  $(B/B_0) < 0.50$

± :  $0.50 \leq (B/B_0) < 0.80$

— :  $0.80 \leq (B/B_0)$

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta$ A(1-16)量

B<sub>0</sub> : 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta$ A(1-16)量

第 3 表

抗 $\beta$ -アミロイド(35-43)モノクローナル抗体の反応性

反応性 1)				
ハイブリドーマ株 No.	$\beta$ A(35-43)	脳画分	クラス/サブクラス	備考
1	+	—		
2	±	—		
3	+	—	IgA, $\kappa$	BC-25
4	+	—	IgG3, $\kappa$	BC-35
5	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-05
6	+	—		
7	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-15
8	+	±	IgG3, $\kappa$	BC-65
9	+	—		
10	+	±		
11	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-75
12	+	±		
13	+	—	IgM, $\kappa$	BC-95
14	+	±		
15	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-55
16	+	±		
17	+	—		
18	+	—		

1) 500 ng/mlの $\beta$ A(35-43)あるいは100  $\mu$ g/mlのアルツハイマー病患者脳抽出物が存在したとき

+:  $(B/Bo) < 0.6$

±:  $0.6 \leq (B/Bo) < 0.8$

—:  $0.8 \leq (B/Bo)$

ただし、B: 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta$ A(35-43)量

Bo: 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta$ A(35-43)量

第 4 表

抗 $\beta$ -アミロイド(18-28)モノクローナル抗体の反応性

反応性 1)				
ハイブリドーマ株 No.	$\beta A(17-28)$	$\beta A(18-28)$	$\beta A(1-28)$	備考
1	+	+	-	
2	-	+	-	BP-01
3	-	+	-	BP-02
4	+	+	-	BP-03
5	±	+	-	
6	+	+	-	BP-90
7	-	+	-	
8	-	+	-	
9	±	+	-	

1) 500ng/mlの $\beta A(17-28)$ 、 $\beta A(18-28)$ あるいは $1\mu g$ の $\beta A(1-28)$ が存在したとき

+:  $(B/Bo) < 0.6$

±:  $0.6 \leq (B/Bo) < 0.8$

-:  $0.8 \leq (B/Bo)$

ただし、B: 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta A(18-28)$ 量

Bo: 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta A(18-28)$ 量



次に、これらのハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞としてBALB/Cマウスの胸腺細胞をウェル当り $5 \times 10^5$ 個になるように加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル0.5mlを腹腔内投与されたマウス(BALB/C)に $1 \sim 3 \times 10^6$ セル/匹を腹腔内投与したのち、6～20日後に抗体含有腹水を採取した。

モノクローナル抗体は得られた腹水よりプロテイン-Aカラムにより精製した。即ち、腹水6～20mlを等量の結合緩衝液(3.5M NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>を含む1.5Mグリシン、pH9.0)で希釈したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコンビナントプロテイン-A-アガロース(Repligen社製)カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液(0.05%NaN<sub>3</sub>を含む0.1Mクエン酸緩衝液、pH3.0)で溶出した。溶出液はPBSに対して4℃、2日間透析したのち、0.22μmのフィルター(ミリポア社製)により除菌濾過し4℃あるいは-80℃で保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定に際しては、精製モノクローナル抗体結合固相を用いるエンザイム-リンクトイムノソーベントアッセイ(ELISA)法を行った。すなわち、抗体2μg/mlを含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で24時間放置した。上記実施例5で述べた方法に従って、ウェルの余剰の結合部位をブロックエースでふさいだのち、アイソタイプタイピングキット(Mouse-Typer™ Sub-Isotyping Kit バイオラッド社製)を用いるELISAによって固相化抗体のクラス、サブクラスを調べた。

#### 〔実施例7〕競合法酵素免疫測定法

##### (1) 競合法-EIA(その1)

β-アミロイド(1-40)あるいはβ-アミロイド(25-35)

を免疫原として作製したモノクローナル抗体の反応特異性を以下の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例 5

(1) または実施例 5 (2) 記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約 40%となる抗体濃度 (約 3~15 ng/ml) を決定した。次に、上記実施例 5 記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファー A で希釈された抗体溶液 50  $\mu$ l、 $\beta$ -アミロイドあるいは  $\beta$ -アミロイド部分ペプチド、すなわち  $\beta$ -アミロイド (1-40) (以下、免疫測定法用の  $\beta$ -アミロイド (1-40) は Bachem 社より購入したものを使用)、 $\beta$ -アミロイド (1-28) (Peninsula 社より購入) および  $\beta$ -アミロイド (25-35) のバッファー A 溶液 50  $\mu$ l、および上記実施例 4 (1) 記載  $\beta$ -Gal 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-40) (バッファー A で 100 倍希釈) を 50  $\mu$ l 加え、4  $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。反応後、PBS で洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例 5 (2) 記載の方法により測定した。結果を [第 1 表] に示す。いずれの抗体も  $\beta$ -Gal 標識化  $\beta$ -アミロイド (1-40) と反応し、また  $\beta$ -アミロイド (1-40) に対しても反応性を有していた [第 1 表]。

典型例として、 $\beta$ -アミロイド (1-40) あるいは  $\beta$ -アミロイド (25-35) に対するモノクローナル抗体として、それぞれ BA-27a (IgG2a,  $\kappa$ ) あるいは BS-85a (IgG1,  $\kappa$ ) を用いた場合の競合法-EIAの結果を [第 6 図] に示した。BA-27a の  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線から、 $(B/B_0) = 0.5$  を与える  $\beta$ -アミロイド (1-40) 濃度は、200 nM、40 ng/well であることが分かった。また、この抗体は  $\beta$ -アミロイド (1-16)、 $\beta$ -アミロイド (1-28) および  $\beta$ -アミロイド (25-35) に

対しては交差反応性を示さないことから、 $\beta$ -アミロイドのC端側の部分ペプチドに反応するものの、 $\beta$ -アミロイド(25-35)の部分構造を認識するものではないことが分かった〔第6図(a)〕。一方、BS-85aの $\beta$ -アミロイド(25-35)の部分構造に対する反応性( $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 20 nM、1 ng/well)は、 $\beta$ -アミロイド(1-40)に対する反応性( $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 800 nM、160 ng/well)の40倍であることが分かった〔第6図(b)〕。

## (2) 競合法-EIA (その2)

抗 $\beta$ -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体の反応特異性を同様の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例5(3)記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約40%となる抗体濃度(約30~50 ng/ml)を決定した。次に、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファーCで希釈された抗体溶液50  $\mu$ l、 $\beta$ -アミロイドあるいは $\beta$ -アミロイド部分ペプチド、すなわち $\beta$ -アミロイド(1-40)、 $\beta$ -アミロイド(1-28)、[Cys<sup>17</sup>] $\beta$ -アミロイド(1-16)のバッファーC溶液50  $\mu$ l、および上記実施例4(2)記載HRP標識化 $\beta$ -アミロイド(1-16)(バッファーCで2000倍希釈)を50  $\mu$ l加え、4℃で16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例5(3)記載の方法により測定した。結果を〔第2表〕に示す。当初選択したモノクローナル抗体8種類のうちのうち4種類が $\beta$ -アミロイド(1-40)とも比較的強く反応し、さらにその後新たに選択したモノクローナル抗体16種類のうち10種類が $\beta$ -アミロイド(1-40)とも比較的強く反応した〔第2表〕)。典型例として、これらの中で

$\beta$ -アミロイド (1-40) に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体 BAN-052a (IgG1,  $\kappa$ ) および BAN-50a (IgG1,  $\kappa$ ) の競合法-EIAの結果を〔第7図〕に示す。これらの抗体が  $\beta$ -アミロイド (1-40)、 $\beta$ -アミロイド (1-28)、 $\beta$ -アミロイド (1-16) に対して同程度の反応性を有することが分かる。また、〔第8図〕に、これら2種類の抗体に加え、当初選択した  $\beta$ -アミロイド (1-40) に対して高い反応性を示したモノクローナル抗体3種類、BAN-11a (IgG1,  $\kappa$ )、BAN-20a (IgG1,  $\kappa$ ) および BAN-30a (IgG1,  $\kappa$ ) を用いた競合法-EIAにおける  $\beta$ -アミロイド (1-40) の標準曲線を示した。これらの抗体の  $(B/B_0) = 0.5$  を与える  $\beta$ -アミロイド (1-40) 濃度は  $25 \sim 70 \text{ nM}$  ( $5 \sim 15 \text{ ng/well}$ ) の範囲内にあり、抗体間で3倍未満の差しか認められなかった。そのなかで、BAN-50a を用いる競合法-EIAが最も高感度であり、約  $0.6 \text{ ng/well}$  [ $(B/B_0) = 0.9$ ] の  $\beta$ -アミロイド (1-40) を検出可能であった。

### (3) 競合法-EIA (その3)

アルツハイマー病患者脳 10 g より、森らの方法 (本文参照) に従って  $\beta$ -アミロイド画分 (蟻酸抽出物) 0.1 g を得た。次に、上記実施例7 (2) 記載の方法に従って、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート、抗体溶液、 $\beta$ -アミロイドまたはその部分ペプチド、すなわち  $\beta$ -アミロイド (1-40)、[Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -アミロイド (35-43)、あるいは上記アルツハイマー病患者脳由来  $\beta$ -アミロイド画分、および上記実施例4 (3) 記載HRP標識化  $\beta$ -アミロイド (35-43) (バッファーCで50倍希釈) を反応させた。結果を〔第3表〕に示す。当初選択したモノクローナル抗体のうち、4種類がアルツハイ

マー病患者脳由来 $\beta$ -アミロイド画分と比較的強く反応した。これらの中から、高い抗体価を示したモノクローナル抗体BC-05a (IgG1,  $\kappa$ ) を選択し、以下の実験に用いた。

#### (4) 競合法EIA (その4)

抗 $\beta$ -アミロイド(18-28)モノクローナル抗体の反応特異性を上記実施例7(2)記載の方法により調べた。すなわち、各抗体濃度を決定したのち、 $\beta$ -アミロイドあるいは $\beta$ -アミロイド部分ペプチドとして $\beta$ -アミロイド(1-40)、[Cys<sup>29</sup>] $\beta$ -アミロイド(17-28) (アコード社製)、[Cys<sup>29</sup>] $\beta$ -アミロイド(18-28) および $\beta$ -アミロイド(1-28)を用い、標識化抗原として上記実施例4(4)記載HRP標識化 $\beta$ -アミロイド(18-28) (バッファCで1000倍希釈)を用いて反応させ、反応後の酵素活性を測定した。結果を[第4表]に示す。選択した9種類の抗体はいずれも、抗原である $\beta$ -アミロイド(18-28)と高い反応性を有しており、さらにそのうち5種類の抗体は $\beta$ -アミロイド(17-28)とも比較的強く反応した。いずれの抗体も $\beta$ -アミロイド(1-28)および $\beta$ -アミロイド(1-40)とは反応しなかった。

これらのうち、 $\beta$ -アミロイド(17-28)および $\beta$ -アミロイド(18-28)の両者と高い反応性を有するモノクローナル抗体BP-90a (IgG1,  $\kappa$ ) を今後の実験で主に用いることとした。

[実施例8] HRP標識化抗 $\beta$ -アミロイドモノクローナル抗体の作製

#### (1) BS-85a-HRP

BS-85a精製画分4.2mg (28nmol)を含む0.1Mリン酸緩衝液、pH6.8溶液にGMB S420nmolを含むDMF 50 $\mu$ lを加え、室温で40分反応させた。反応液をセファデックスG-25カラム(溶離液、0.1Mリン酸緩衝液、pH6.7)で分離し、

マレイミド基の導入された抗体画分 3 mg を得た。次に、HRP 12 mg (300 nmol) を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (0.15 M NaCl も含む)、pH 6.8、1.4 ml に SPDP 4.5  $\mu$ mol を含む DMF 50  $\mu$ l を加え、室温で 40 分反応させた。次に、68  $\mu$ mol のジチオスレイトールを含む 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.5 ml を加え、室温で 20 分反応させた後セファデックス G-25 カラム (溶離液、2 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6) で分離し、SH 基の導入された HRP 8 mg を得た。次に、SH 基の導入された HRP 8 mg とマレイミド基の導入された抗体画分 3 mg とを混合し、コロジオンバッグ (ザルトリウス社製) で約 0.3 ml にまで濃縮したのち、4°C で 16 時間放置した。反応液を溶離液に 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.5 を用いる ウルトロゲル AcA 34 カラムに供し、BS-85a-HRP 複合体画分を精製した。

(2) BA-27a-HRP

同様の方法により、BA-27a 精製画分 4.7 mg と HRP 14 mg を用いて BA-27a-HRP 複合体を作製した。

(3) BAN-052a-HRP

同様の方法により、BAN-052a 精製画分 5 mg と HRP 14 mg を用いて BAN-052a-HRP 複合体を作製した。

(4) BC-05a-HRP

同様の方法により、BC-05a 精製画分 5 mg と HRP 14 mg とを用いて BC-05a-HRP 複合体を作製した。

[実施例 9] サンドイッチ法-EIA (1)

(1) BS-85a-HRP を用いる サンドイッチ法-EIA

上記実施例 6 記載の精製したモノクローナル抗体 BAN-052a、BAN-11a、BAN-20a、BAN-30a、BS-85a また

はBA-27aを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む $0.1\text{M}$ 炭酸緩衝液、 $\text{pH}9.6$ 溶液を96ウェルマイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 $4^{\circ}\text{C}$ で24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位をPBSで4倍希釈したブロックエース $300\mu\text{l}$ を加え不活化した。

以上のように調製したプレートに、バッファ-E〔 $10\%$ ブロックエース、 $0.2\%$ BSA、 $0.4\text{M}$ NaCl、 $0.05\%$ CHAPS、 $0.05\%$ NaN<sub>3</sub>を含む $0.02\text{M}$ リン酸緩衝液、 $\text{pH}7$ 〕で希釈した $\beta$ -アミロイド(1-40)標準液 $100\mu\text{l}$ を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8(1)で作製したBS-85a-HRP(バッファ-Cで $1500$ 倍希釈) $100\mu\text{l}$ を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例5(3)記載の方法によりTMBを用いて固相上の酵素活性を測定した(酵素反応20分)。結果を〔第9図〕に示す。実施例7に記したように、BS-85aの競合法EIAにおける $\beta$ -アミロイド(1-40)に対する反応性は高いものではなかった。しかし、上記のように $\beta$ -アミロイド(1-16)を免疫原とするモノクローナル抗体を固相に用いるサンドイッチ法-EIAの標識抗体として用いる場合には、極めて高感度に $\beta$ -アミロイド(1-40)を検出することがわかった。特に、BAN-052aの固相を用いたとき、他の3種類の抗体固相と比較して $10\sim30$ 倍高感度であり、 $3\text{pg}/\text{well}$ の $\beta$ -アミロイド(1-40)を検出することが可能であった。

#### (2) BA-27a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIA

同様に、BAN-052a、BAN-11a、BAN-20a、BAN-30a、BS-85aまたはBA-27aを固定したマイクロプレートに $\beta$ -アミロイド(1-40)標準液 $100\mu\text{l}$ を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8(2)で作製

したBA-27a-HRP（バッファーCで2500倍希釈）100 $\mu$ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBにより測定した（酵素反応20分）。結果を〔第10図〕に示す。BS-85aの場合と同様、BA-27aも競合法EIAにおいては $\beta$ -アミロイド（1-40）に対し高い反応性を示さなかった。しかし、上記のようなサンドイッチ法-EIAの標識抗体として用いる場合には、BS-85aよりもさらに高感度に $\beta$ -アミロイド（1-40）を検出することがわかった。特に、BAN-052aの固相を用いたとき、他の3種類の抗体固相と比較して約30倍高感度であり、0.6 pg/wellの $\beta$ -アミロイド（1-40）を検出することが可能であった。

### （3）BAN-052a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIA

BS-85aまたはBA-27aを固定したマイクロプレートに $\beta$ -アミロイド（1-40）標準液100 $\mu$ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8（3）で作製したBAN-052a-HRP（バッファーCで2500倍希釈）100 $\mu$ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBにより測定した（酵素反応20分）。結果を〔第11図〕に示す。このように、実施例8（2）とは逆の系、すなわち、BS-85aまたはBA-27aのC端抗体を固相とし、BAN-052aのN端抗体を標識体とするサンドイッチ-EIAにおいても、それぞれ約80 pg/wellおよび10 pg/wellの $\beta$ -アミロイド（1-40）を検出することが可能であった。

また、BAN-052aを固相とするサンドイッチ-EIAにおいて、標識体にもBAN-052a-HRPを用いた場合（バッファーCで1000倍希釈）には、BA-27a-HRPを用いた場合（バッファー



Cで1500倍希釈)と比較して、検出感度が1/100以下となることから、本発明で用いている実験条件下では多量体の $\beta$ -アミロイド(1-40)はほとんど存在しないことが示唆される〔第12図〕。

〔実施例10〕 サンドイッチ法-EIA(2)

抗 $\beta$ -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体のなかで、BAN-052aが群を抜いて高感度のサンドイッチ-EIAを与えたことから、サンドイッチ-EIAにより適した抗 $\beta$ -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体を選択すべくさらに16種類の抗体を作製した〔第2表〕。その結果、BAN-50aを得ることができた。〔第13図〕および〔第14図〕にBAN-50aを固相抗体とするサンドイッチ-EIAの結果を示した。アッセイ方法は上記実施例9(3)に従ったが、標識体濃度としてBS-85a-HRPは1000倍希釈〔第13図〕、BA-27a-HRPは1500倍希釈〔第14図〕を用いた。また、これら測定系の特異性を調べるため、 $\beta$ -アミロイド(1-28)に対する反応性も検討した〔図中で●および▲が $\beta$ -アミロイド(1-40)に対する反応性を、また○および△が $\beta$ -アミロイド(1-28)に対する反応性を示す〕。その結果、いずれの標識体を用いても、BAN-50a固相を用いた場合にはBAN-052a固相を用いた場合と比較して2~3倍高感度であり、BA-27a-HRP標識体と組み合わせたとき0.2pg/wellの $\beta$ -アミロイド(1-40)を検出可能であった。また、いずれの測定系も $\beta$ -アミロイド(1-28)を検出せず、 $\beta$ -アミロイド(1-40)に特異的であることが分かった。

〔実施例11〕 サンドイッチ法-EIA(3)

(1) BS-85a-HRPまたはBA-27a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性

実施例10に示したようにBAN-50aを固相抗体として用い、標

識体としてBS-85a-HRPまたはBA-27a-HRPを用いる2種類のサンドイッチ法-EIAの測定系の特異性をさらに詳しく検討した。アッセイ方法は上記実施例10に従ったが、標識体濃度としてBS-85a-HRPは670倍希釈、BA-27a-HRPは1000倍希釈を用い、 $\beta$ -アミロイド(1-38)、 $\beta$ -アミロイド(1-39)、 $\beta$ -アミロイド(1-40)、 $\beta$ -アミロイド(1-42)および $\beta$ -アミロイド(1-28)に対する反応性を調べた(〔第15図〕(a)、(b))。ここで、 $\beta$ -アミロイド(1-38)および $\beta$ -アミロイド(1-39)は実施例1(5)で作製したものを用いた。実施例1(5)で $\beta$ -アミロイド(1-38)および $\beta$ -アミロイド(1-39)に対応した逆相HPLCの溶出画分中のそれぞれの濃度は、実施例7(2)の方法に従い、BAN050aを用いる競合法EIAにより決定した。その結果、標識体としてBS-85a-HRPを用いた測定系は(〔第15図〕(a))、 $\beta$ -アミロイド(1-38)、 $\beta$ -アミロイド(1-39)、および $\beta$ -アミロイド(1-40)をほとんど同一の感度(0.7 pg/well)で検出し、 $\beta$ -アミロイド(1-42)については上記の3種の $\beta$ -アミロイドに対する感度と比較して1/2から1/3の感度で検出することがわかった。また、 $\beta$ -アミロイド(1-28)は全く検出せず、実施例10と同様の結果を得た。一方、標識体としてBA-27a-HRPを用いた測定系は(〔第15図〕(b))、 $\beta$ -アミロイド(1-40)、 $\beta$ -アミロイド(1-42)をそれぞれ0.2 pg/well、18 pg/wellの感度で検出した。また、 $\beta$ -アミロイド(1-38)、 $\beta$ -アミロイド(1-39)についてはそれぞれ85 pg/well、17 pg/wellの検出が可能であった。

以上の結果から、標識体としてBS-85a-HRPを用いた測定系は $\beta$ -アミロイドのC端部に非特異的であり、標識抗体の免疫原として

用いた部分ペプチドである $\beta$ -アミロイド(25-35)の配列を含む $\beta$ -アミロイドに対しては、ほぼ同等の感度を有することがわかった。一方、標識体としてBA-27a-HRPを用いた測定系は $\beta$ -アミロイド(1-40)のC末端に特異的と考えられ、 $\beta$ -アミロイド(1-38)、 $\beta$ -アミロイド(1-39)および $\beta$ -アミロイド(1-42)に対しては2%以下の交差反応性で弱く反応することがわかった。

(2) BC-05a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性と感度

固相抗体としてBAN-50aを用い、標識体として上記実施例8(4)で作製したBC-05a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性および感度を調べた。上記実施例11(1)と同様にして $\beta$ -アミロイド(1-38)、 $\beta$ -アミロイド(1-39)、 $\beta$ -アミロイド(1-40)、 $\beta$ -アミロイド(1-42)および $\beta$ -アミロイド(1-28)に対する反応性を調べたが、標識体濃度としては200倍希釈のものを用いた(〔第15図〕(c))。その結果、このBC-05a-HRPを用いたサンドイッチ法-EIAは、0.7 pg/wellの $\beta$ -アミロイド(1-42)を検出することが可能だったが、 $\beta$ -アミロイド(1-42)以外の4種の $\beta$ -アミロイド、すなわち $\beta$ -アミロイド(1-38)、 $\beta$ -アミロイド(1-39)、 $\beta$ -アミロイド(1-40)および $\beta$ -アミロイド(1-28)は全く検出しなかった。したがって、固相抗体としてBAN-50aを用い、標識体としてBC-05a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAは、 $\beta$ -アミロイド(1-42)を極めて高感度にかつ極めて選択的に検出することが可能であるとわかった。

以上の結果から、固相抗体としてBAN-50aを用い、標識体としてBA-27a-HRPまたはBC-05a-HRPを用いる2種類の

測定系を組み合わせることにより、 $\beta$ -アミロイド（1-40）および  
 $\beta$ -アミロイド（1-42）の分別定量ができることがわかった。

〔実施例12〕モノクローナル抗体固定化アフィニティ固相の作製

（1）BAN-052a 固定化アフィニティ固相の作製

BAN-052a を充填剤に固定化することにより、アフィニティ固相を作製した。即ち、BAN-052a 45 mg と TSK gel AF-  
ートレシルトヨパール 650M（東ソー株式会社製）5 g とを 0.5  
M NaCl 含有 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液中、4℃で一晩反  
応させた。反応後、0.5 M の食塩水で洗浄し、余剰の活性基をふさぐ  
ため、0.5 M NaCl 含有 0.1 M トリス-塩酸（pH 8.0）中、  
室温で1時間反応させた。得られたBAN-052a-ートレシルトヨパ  
ール 25 ml は PBS で洗浄後、バッファー E 中、4℃で保存した。

（2）BA-27a 固定化アフィニティ固相の作製

上記（1）と同様にして、BA-27a を充填剤に固定化すること  
によりアフィニティ固相を作製した。すなわち、BA-27a 15 mg  
と TSK gel AF-ートレシルトヨパール 650M 2 g とを反応させ、  
10 ml の BA-27a-ートレシルトヨパールを得た。

〔実施例13〕アルツハイマー病患者脳脊髄液中の $\beta$ -アミロイドの分  
析

上記実施例12（1）で作製したBAN-052a 固定化アフィニテ  
ィ固相により精製したアルツハイマー病患者の脳脊髄液を逆相-HPL  
Cで分画し、サンドイッチ-EIAによって分析した。

まず、アルツハイマー病患者の脳脊髄液 1.5 ml をバッファー E で  
2 倍に希釈後、BAN-052a-ートレシルトヨパール充填カラム（0.  
8×0.3cm）より溶出し部分精製した。溶離液には、0.2% トリフル  
オロ酢酸含有 60% アセトニトリルを用いた。次に、この溶出画分を

濃縮後、実施例 1 (5) 記載の方法により V y d a c C 4 を用いる逆相-HPLC によって分離し、実施例 10 記載の B A N-50 a 結合固相と B S-85 a-HRP あるいは B A-27 a-HRP とを用いるサンドイッチ-EIA で溶出画分中の  $\beta$ -アミロイドを定量した。結果を〔図 16〕に示す。分画 N o. 59 は、合成  $\beta$ -アミロイド (1-40) の溶出位置にほぼ一致したため、〔第 16 図〕(a) (b) で共に検出された免疫活性は  $\beta$ -アミロイド (1-40) に対するものと考えられた。従って、〔第 16 図〕の結果から、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中には高濃度の  $\beta$ -アミロイド (1-40) が存在することが明らかとなったが、さらに〔第 16 図〕(a) から B S-85 a-HRP のみで検出可能な分子種も少量含まれていることがわかった (分画 N o. 47 および N o. 48)。これらの溶出位置は、 $\beta$ -アミロイド (1-40) の溶出位置よりもアセトニトリル濃度が低いため、分画 N o. 47 および N o. 48 で溶出されるのは  $\beta$ -アミロイド (1-40) よりもより親水性の分子種であると考えられる。実施例 11 の結果より、標識体として B S-85 a-HRP を用いる測定系は、 $\beta$ -アミロイド (1-40) の C 末端から 1、2 残基欠落した分子種に対しても  $\beta$ -アミロイド (1-40) と同等の感度を有することが示された。従って、分画 N o. 47 および N o. 48 に見られる免疫活性は、 $\beta$ -アミロイド (1-40) の C 端部が欠落した分子種に対するものである可能性が高い。

〔実施例 14〕アルツハイマー病患者脳由来  $\beta$ -アミロイド画分の分析  
上記実施例 7 (3) 記載のアルツハイマー病患者脳由来  $\beta$ -アミロイド画分 (ギ酸抽出物) 11mg をギ酸に溶解し、T S K G 3000 P W を用いるゲルろ過により分離した。

カラム条件

カラム：TSK G3000PW（東ソー株式会社製）

溶離液：0.1% トリフルオロ酢酸含有40%アセトニトリル

流速：0.5 ml/分

上記実施例10記載のBAN-50a抗体結合固相とBS-85a-HRPとを用いるサンドイッチ-EIAで溶出画分中の $\beta$ -アミロイドを定量した結果、HPLC溶出時間14分から15分の間に強い免疫活性が認められた。次に、この画分に0.05% CHAPSを添加後濃縮し、実施例1（5）記載の方法によりVydac C4を用いる逆相-HPLCにより分離した。溶出結果を〔図17〕に示す。

得られたNo.35およびNo.41-45の画分それぞれを300 $\mu$ lずつ濃縮したのち、質量分析（HX110、日本電子社製）に付した。No.35、No.41およびNo.43の画分の分析結果を〔図18〕に示す。No.35は $\beta$ -アミロイド（1-40）が、No.41は $\beta$ -アミロイド（1-42）が、また、No.43は $\beta$ -アミロイド（3-42）（分子量18相当分が不足しているためピログルタミン酸になっていると推測される）が主要な構成成分であり、さらにN端部が欠落した他の分子種が混在していた。また、No.35は合成 $\beta$ -アミロイド（1-40）の溶出位置に一致した。

次に、上記実施例11記載の方法により、溶出画分の免疫活性を調べた。各画分3 $\mu$ lを試料とし、BC-05a-HRPは200倍希釈で用いた。結果を〔第19図〕に示す。BS-85aを用いる測定系ではNo.35およびNo.41-45の両ピークが、BA-27aを用いる測定系では主としてNo.35のピークが、またBC-05aを用いる測定系ではNo.41-45のピークが検出された。

以上の結果は、実施例11で示した各測定系の特異性に基づくものであり、実施例13とともに、本発明による測定系がアルツハイマー病の

診断、病因の解明、およびアルツハイマー病の予防・治療を目的とする医薬品の開発において重要な手段を提供できることを示す。

〔実施例 15〕 ヒト型アミロイドタンパク質前駆体 (APP) 遺伝子のクローニング

$\beta$ -アミロイドは巨大な前駆体タンパク質 (APP) のごく一部であり、APP をコードする cDNA はこれまでに 5 種類見いだされている。APP 695、APP 714、APP 751、APP 770、および APP 563 と呼ばれるこれらの cDNA は、同一の APP 遺伝子からオルターナティブスプライシングの結果生じることがわかっている。これらのうちヒト型 APP 695 の高発現用プラスミド DNA を構築するため、ヒト APP 695 遺伝子のクローニングを行った。

まず、強力な SR $\alpha$  プロモーター (モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、第 8 巻、466-472 ページ、1988 年) を持つプラスミド pME18s をベクターとして、ヒト肺ガン細胞由来の細胞である MAC10 の cDNA ライブラリーを作製した。既に報告されているヒト APP の cDNA 塩基配列を基に、タンパク質をコードしている領域より上流側の配列 (センス)

5'-ATCCCACTCGCACAGCAGCGCACTC-3'

(配列番号: 13)

および下流側の配列 (アンチセンス)

5'-TGCTGTCCAACTTCAGAGGCTGCTG-3'

(配列番号: 14)

の合成 DNA を作製し、これをプローブに用いて上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られた cDNA をクローニングし、その塩基配列を合成鎖停止法で決定したところ、すべてが APP 751 をコードする cDNA であった。そこで、 $\lambda$ gt10 をベクターとして作製

されたヒト胎児脳のcDNAライブラリー（ストラタジーン社）を同様の方法でスクリーニングした結果、APP695をコードするcDNAを得た。APP751とAPP695のcDNAの配列はプロテアーゼインヒビター領域を除くと完全に一致しているので、APP751のcDNAを持つプラスミドDNAとAPP695のcDNAを持つファージDNAを切断し再結合させて、APP695のcDNAをSR $\alpha$ プロモーターの下流に結合させたプラスミドDNAを構築した。

〔実施例16〕ヒトAPP695高発現ラットC6グリオーマ細胞の育種

ラットC6グリオーマ細胞（ATCC CCL 107）は、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下、直径10cmの培養用シャーレで、10%ウシ胎児血清を含むDMEMを培地として培養した。上記実施例15で構築したヒトAPP695高発現用プラスミドDNA 20 $\mu$ gをネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドDNA pTB6（セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション、12巻、205-217ページ、1987年）1 $\mu$ gと混合し、80%飽和まで培養したC6グリオーマ細胞にリン酸カルシウム共沈殿法を用いて導入した。24時間後に終濃度750 $\mu$ g/mlのネオマイシン（GIBCO社）を加えて培養を続け、耐性株を選択した。得られた選択株18株をそれぞれ100 $\mu$ lのPBSに懸濁し、凍結融解と超音波処理ののち8%ポリアクリルアミドゲルでSDS電気泳動を行った。タンパク質をニトロセルロース膜に転写後、抗ヒトAPPマウスモノクローナル抗体（ベーリンガー・マンハイム社）を用いたウェスタンブロットを行い、APP695の発現量が最も高いC6-695-18を得た。

〔実施例17〕ヒトAPP695高発現C6グリオーマ細胞培養上清に含まれる3kDaペプチドの検出



上記実施例 1 6 記載ヒト A P P 6 9 5 高発現 C 6 グリオーマ細胞の培養上清中に含まれる  $\beta$ -アミロイド分子種を同定するため、実施例 1 3 と同様の方法で培養上清を精製し、サンドイッチ E I A によって分析した。すなわち、まず、培養上清 1 リットルを上記実施例 1 2 (2) で得られた B A - 2 7 a - トレシルトヨパール充填カラムを用いて部分精製し、この溶出画分を濃縮後 V y d a c C 4 を用いる逆相 H P L C に よって分画した。

#### カラム条件

カラム : V y d a c C 4 (4.6 x 250 mm)

溶離液 : A 液 (0.1%トリフルオロ酢酸含有 5%アセトニトリル)

B 液 (0.1%トリフルオロ酢酸含有 80%アセトニトリル)

溶出方法 : 溶離液 B の濃度を最初の 5 分間に 15% から 25% まで上昇させ、次に 60 分間かけて 25 - 50% に直線的に上昇させた。

流速 : 0.5 ml / 分

実施例 9 (1) 記載の方法に従い B P - 9 0 a を固定化した 96 ウェルマイクロプレート、および標識体として B A - 2 7 a - H R P をもちいて、上記の逆相 H P L C 画分のサンドイッチ E I A を行った。強い免疫活性が認められた分画 No. 28 および No. 38 - 39 を濃縮し質量分析を行ったところ、それぞれ  $\beta$ -アミロイド (20 - 40) または  $\beta$ -アミロイド (18 - 40) が主要な構成成分であることがわかった。以上の結果から、B P - 9 0 a および B A - 2 7 a を用いるサンドイッチ E I A 法は、 $\beta$ -アミロイド C 端側の誘導体を選択的に検出することが可能であるとわかった。従って、本測定系は A P P の代謝を研究する際の

重要な手段を提供するものと考えられる。

#### 産業上の利用可能性

アルツハイマー病患者の脳に特徴的な病変として、老人斑の主要な構成成分の一つである $\beta$ -アミロイドの沈着が知られている。本発明のモノクローナル抗体を用いることによって、C端部疎水的領域を有する $\beta$ -アミロイドを感度よく特異的に定量することができ、この定量方法はアルツハイマー病などの診断に有用である。

## 配列表

配列番号： 1

配列の長さ： 38

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25					30		
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly										
				35											

配列番号： 2

配列の長さ： 39

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25					30		
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val									
				35											

配列番号： 3

配列の長さ： 40

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5				10						15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
			20					25						30	
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val								
			35				40								

配列番号： 4

配列の長さ： 41

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5				10						15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
			20					25						30	
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile							
			35				40								

配列番号： 5

配列の長さ : 42

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

配列番号 : 6

配列の長さ : 42

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

35

40

配列番号 : 7

配列の長さ : 28

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

20

25

配列番号：8

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met

5

10

配列番号：9

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

5

配列番号： 1 0

配列の長さ： 1 6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

配列番号： 1 1

配列の長さ： 1 2

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

5

10

配列番号： 1 2

配列の長さ： 1 1

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

5

10

配列番号： 1 3

配列の長さ： 2 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

ATCCCACTCG CACAGCAGCG CACTC

25

配列番号： 1 4

配列の長さ： 2 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

TGCTGTCCAA CTCAGAGGC TGCTG

25



## 請求の範囲

1.  $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体。
2. 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする請求の範囲第1項記載の抗体。
3. 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする請求の範囲第1項記載の抗体。
4. 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする請求の範囲第1項記載の抗体。
5. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1項、第2項、第3項または第4項記載の抗体。
6. 請求の範囲第5項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。
7. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応するBAN-052aで標示されるモノクローナル抗体。
8. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体。

9. 請求の範囲第7項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

10. 請求の範囲第8項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

11. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体。

12. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第11項記載の抗体。

13. 請求の範囲第12項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

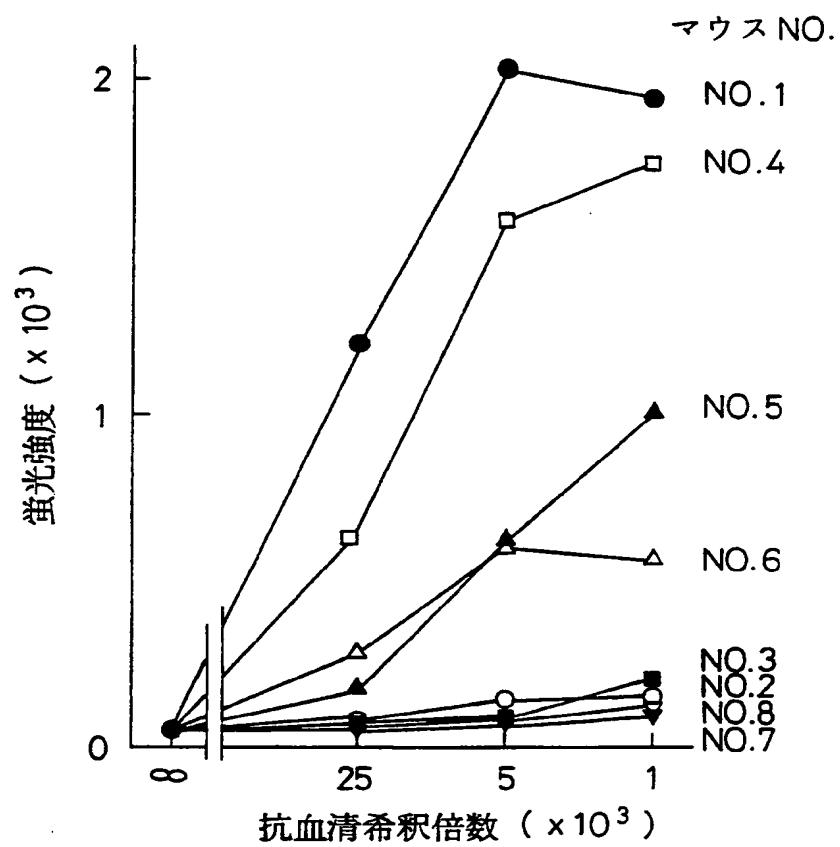
14. 請求の範囲第1項、第7項、第8項または請求の範囲第11項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドまたはその誘導体の定量法。

15. 請求の範囲第1項記載の抗体と、請求の範囲第7項または第8項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドの定量法。

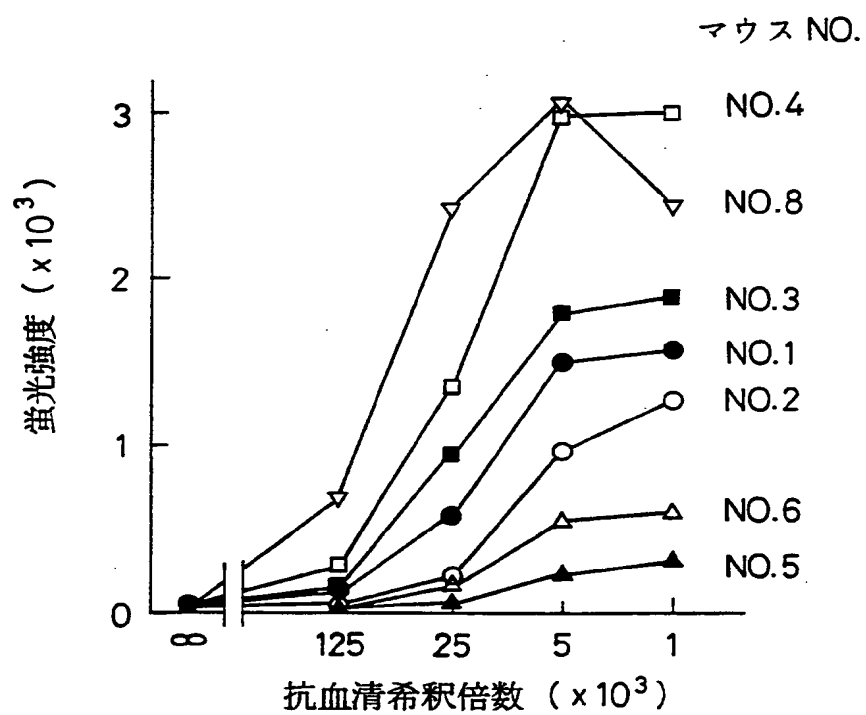
16. 請求の範囲第11項記載の抗体と、請求の範囲第1項、第7項または第8項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の $\beta$ -アミロイドの定量法。

17. アルツハイマー病の診断に用いられる請求の範囲第14項、第15項または第16項記載の定量法。

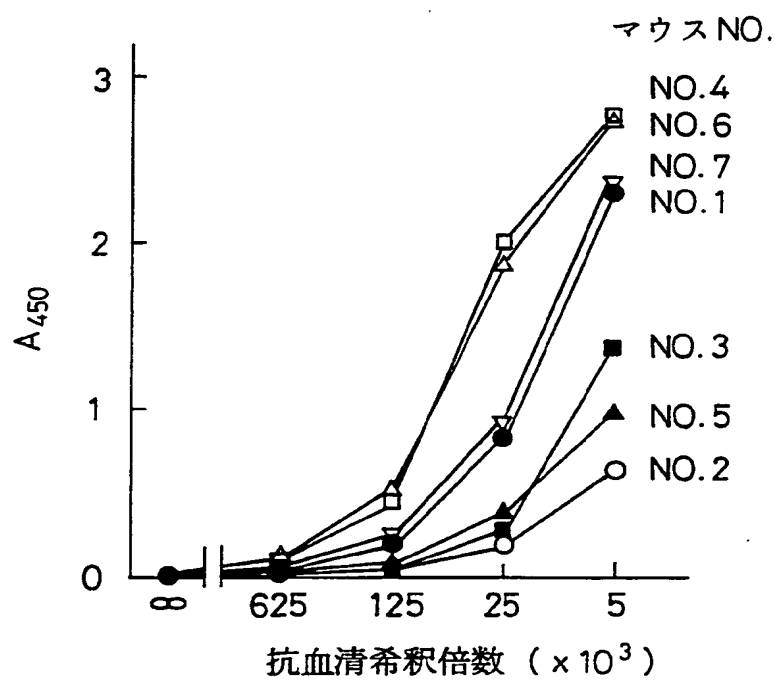
## 第 1 図



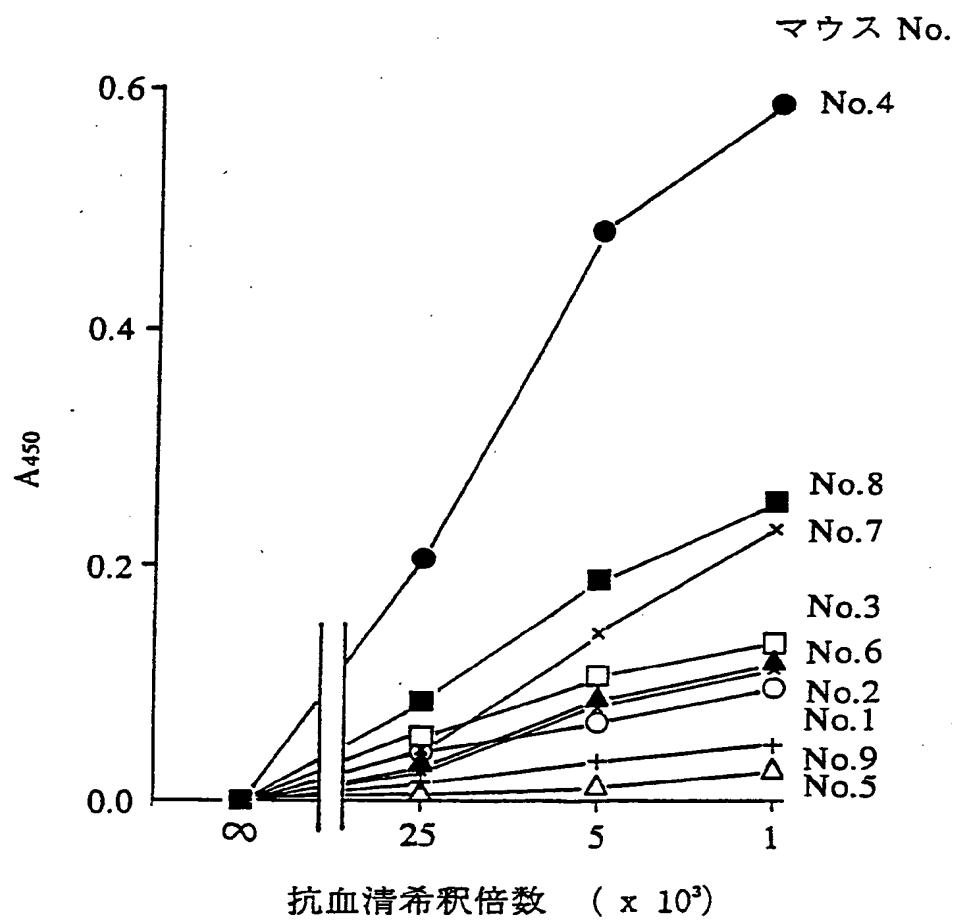
## 第 2 図



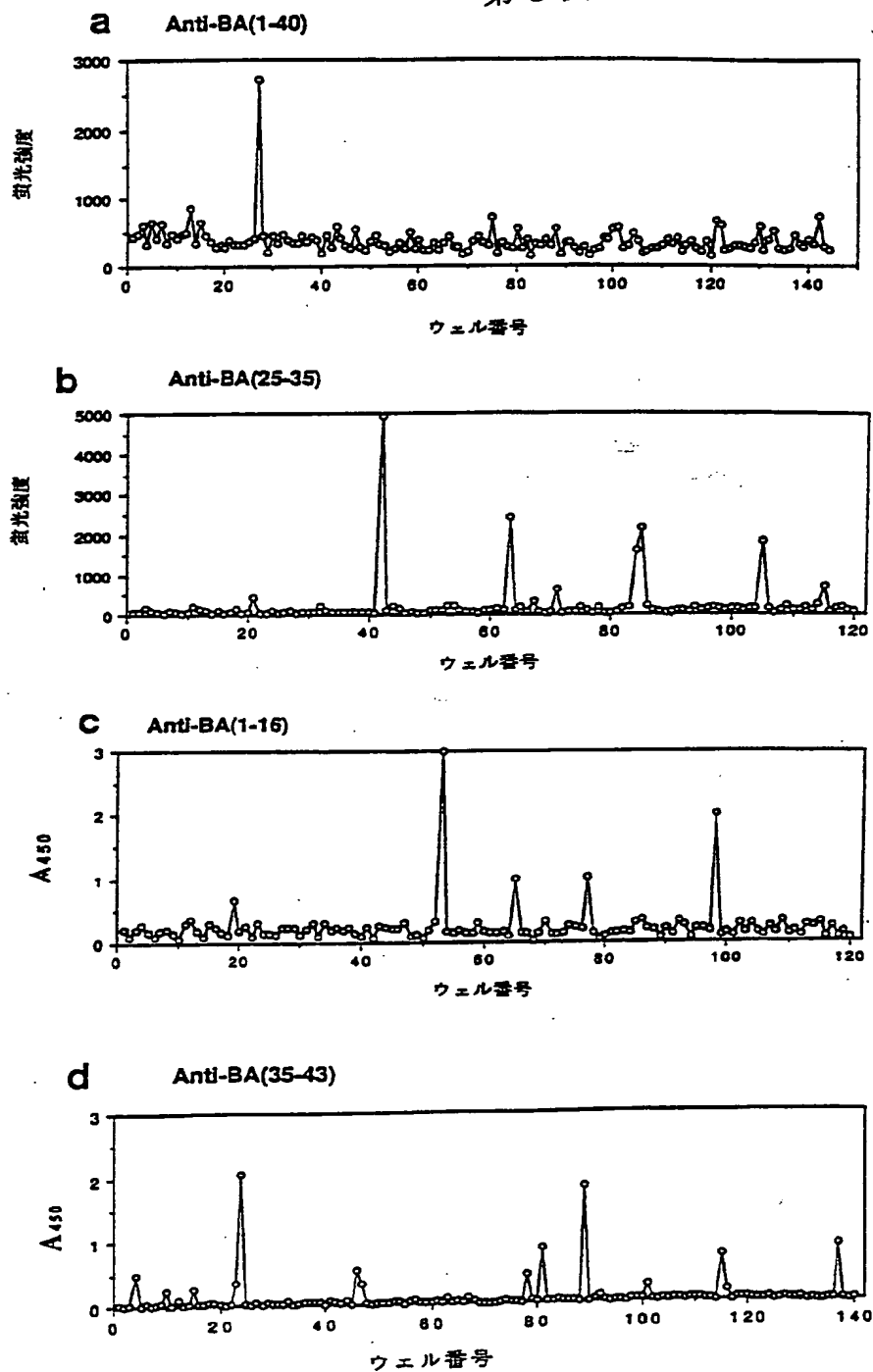
## 第 3 図



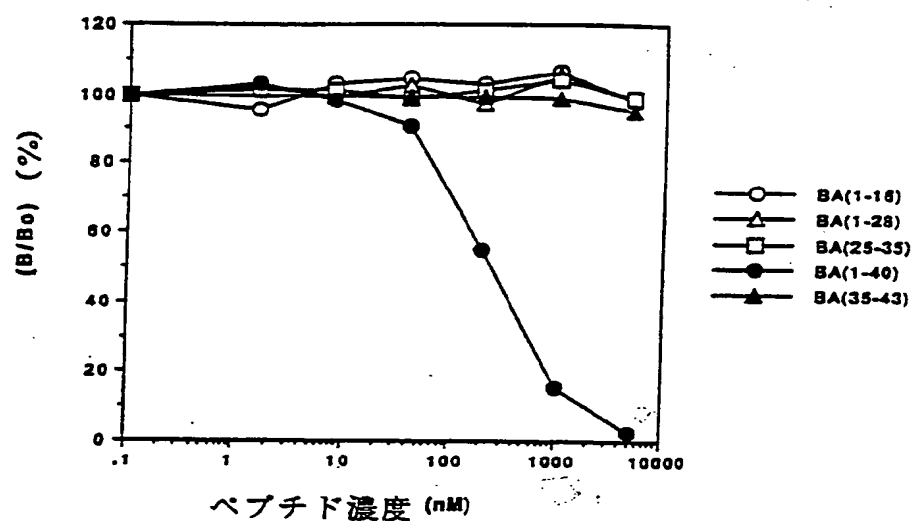
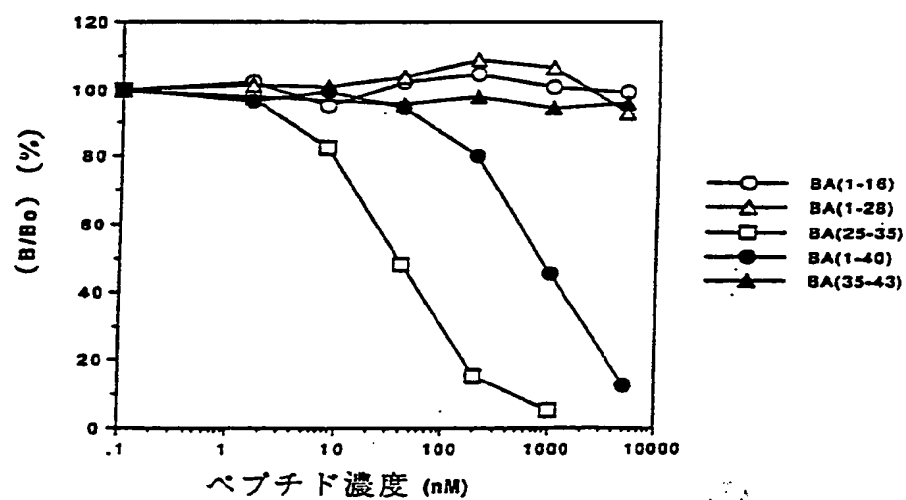
第 4 図



第 5 図

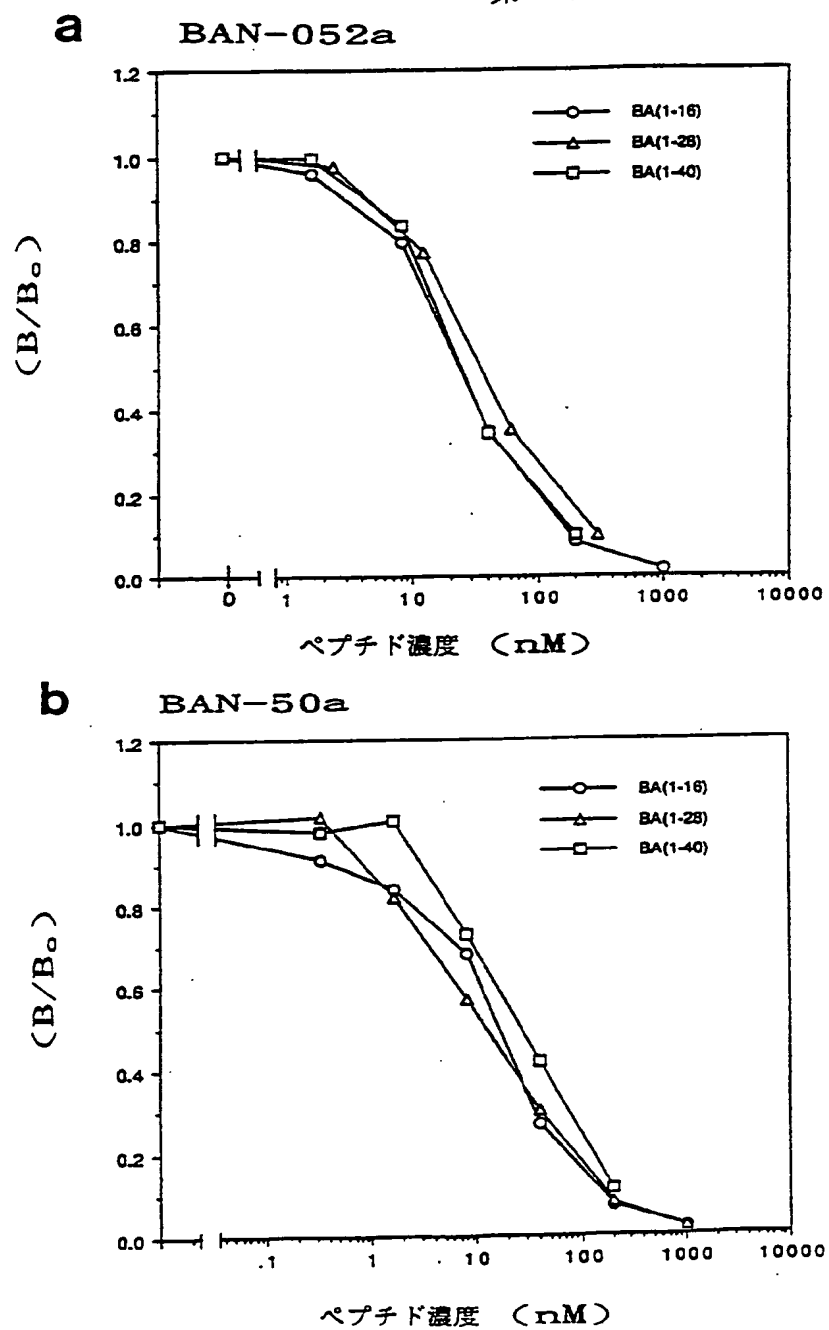


第 6 図

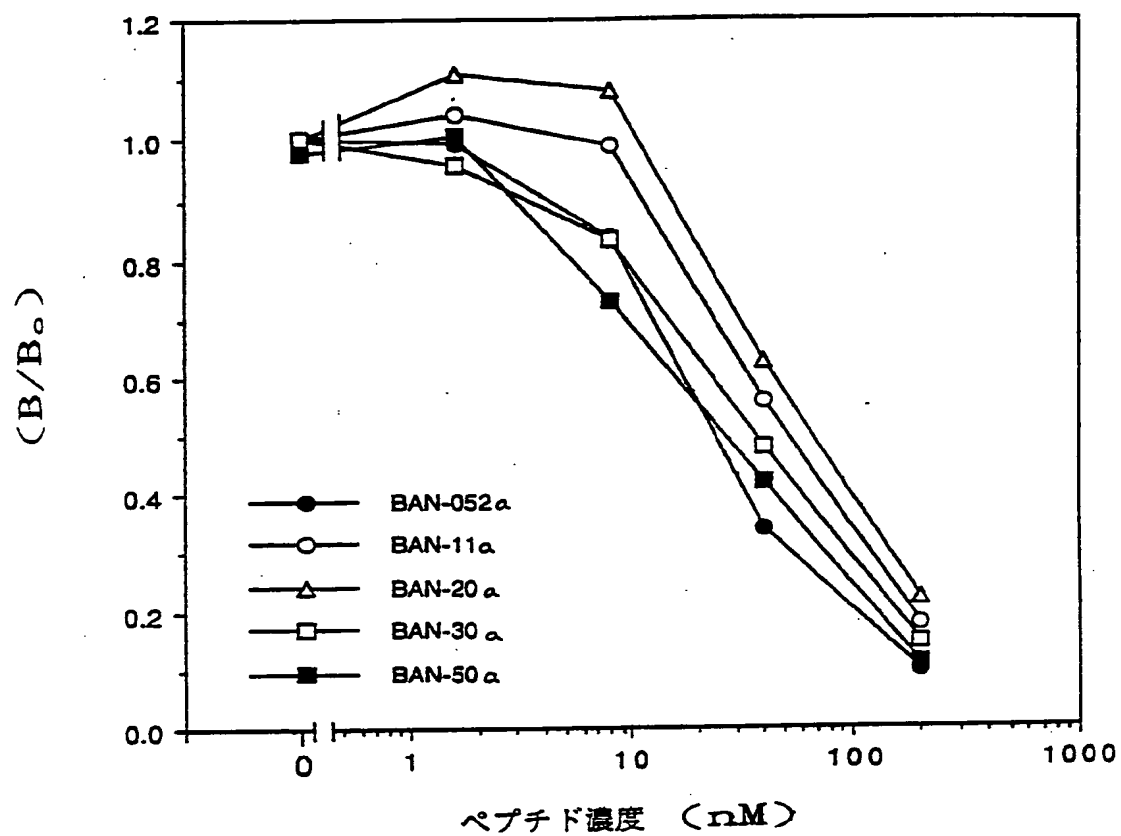
**a** BA-27a**b** BS-85a



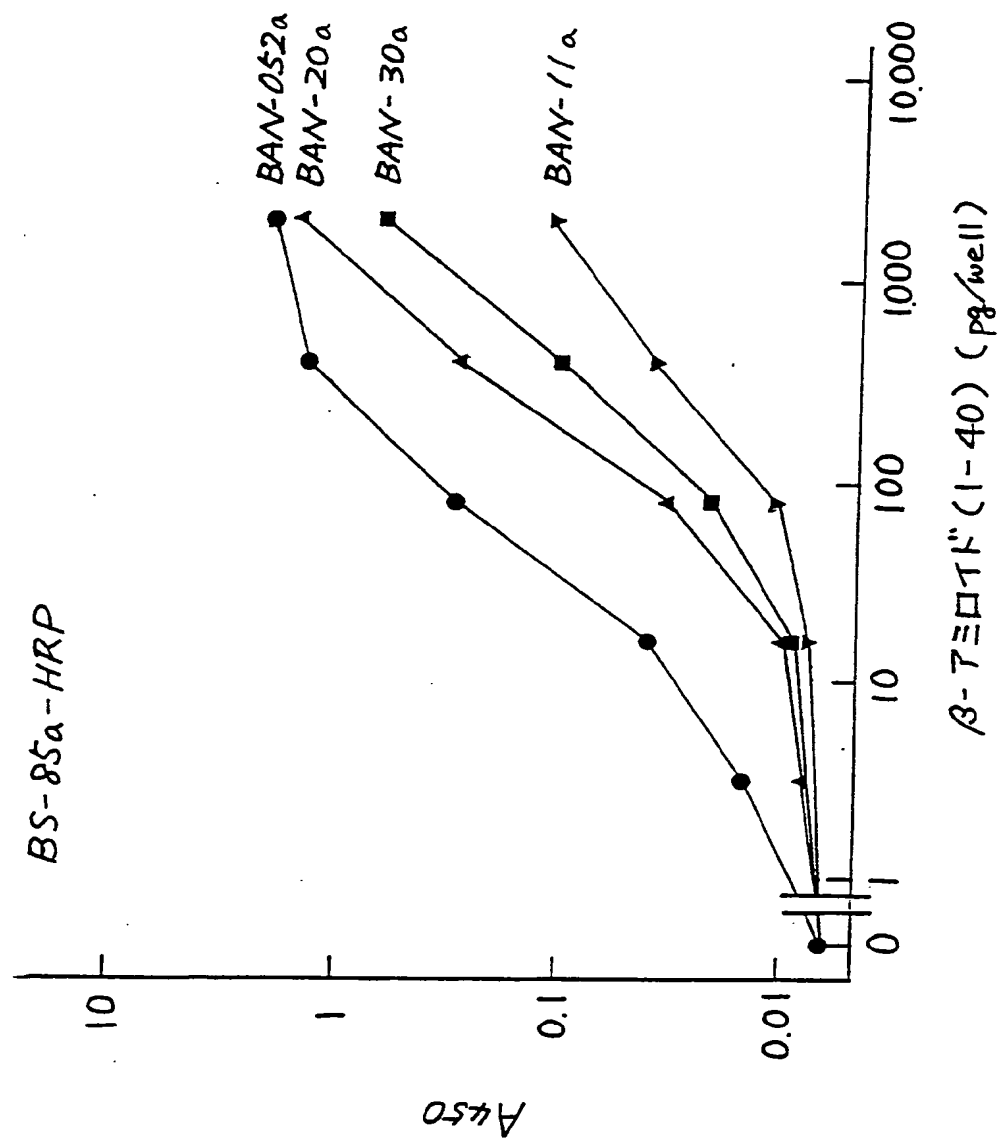
第 7 図



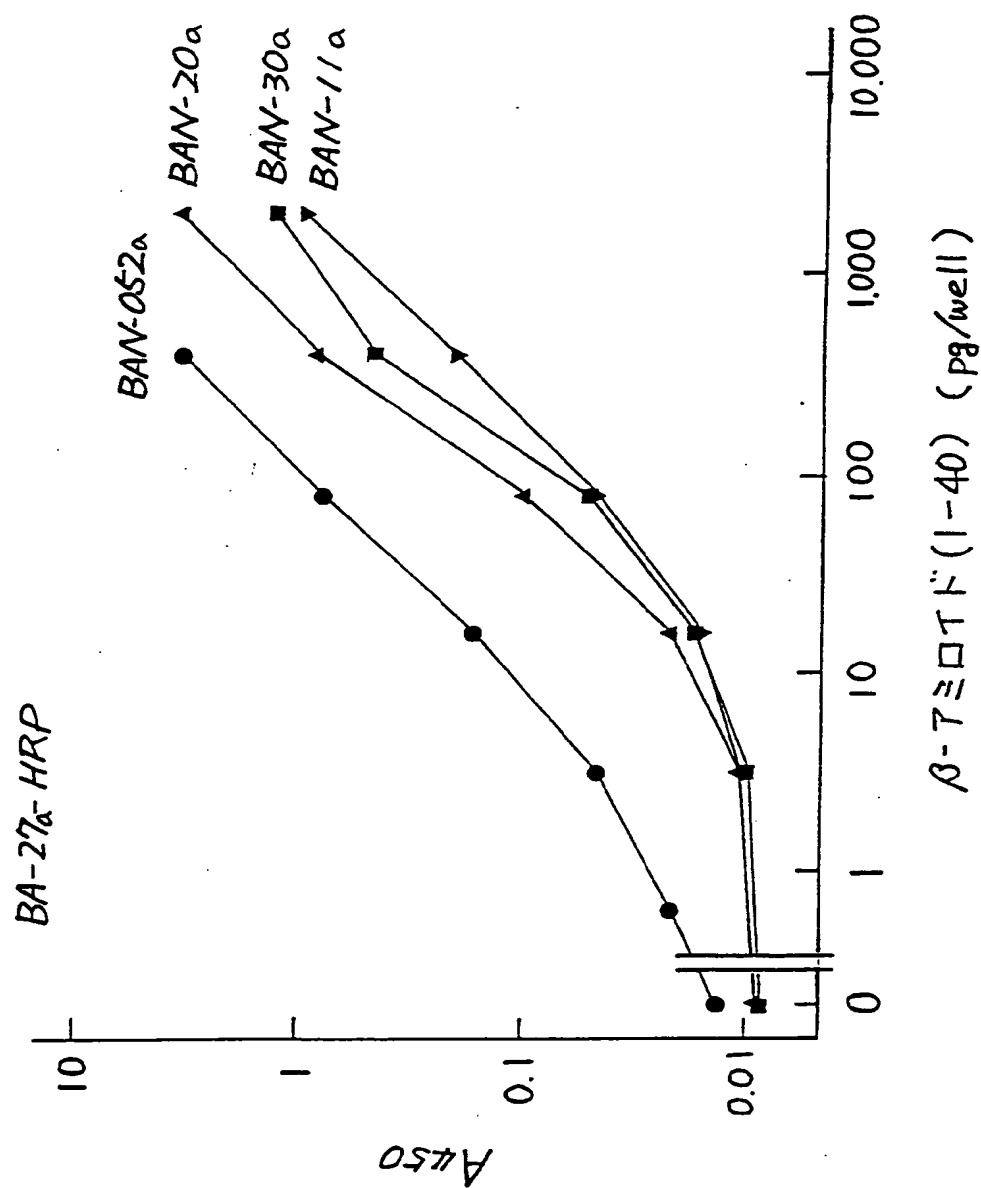
第 8 図



第9図

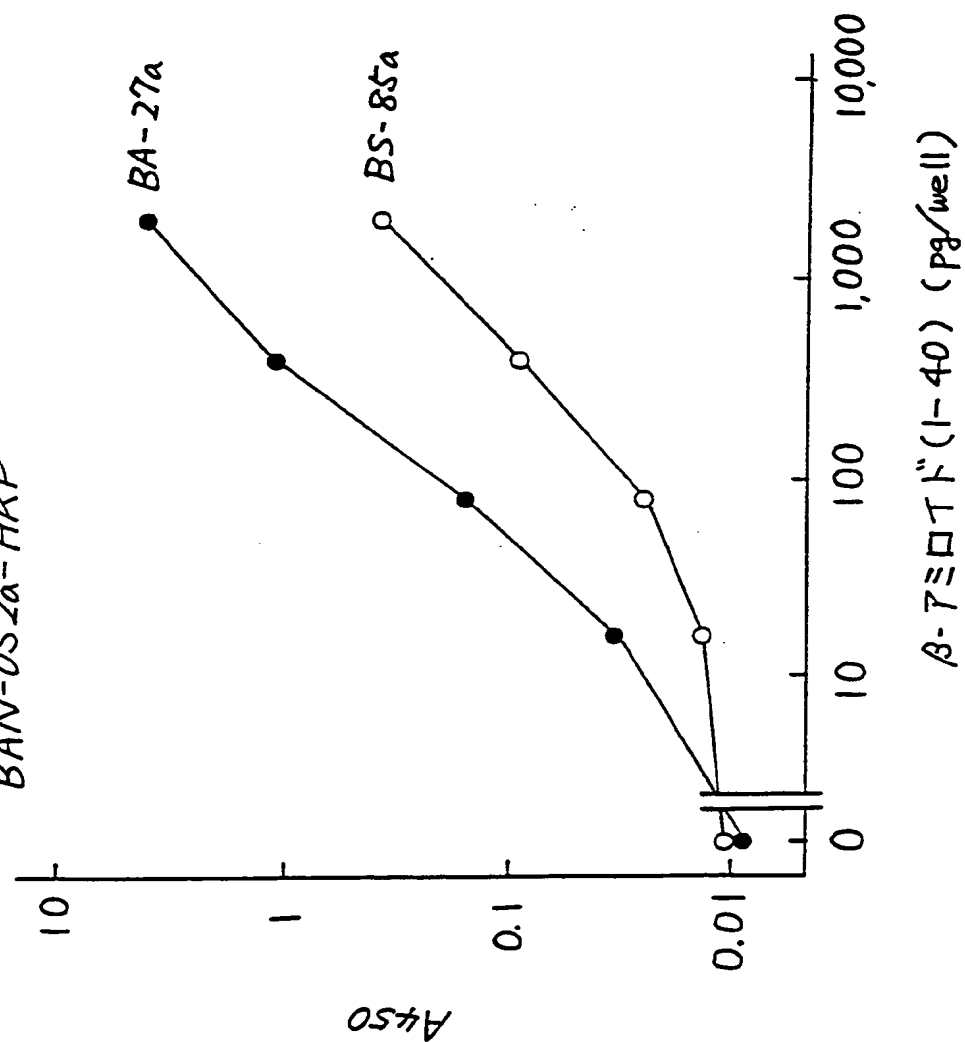


第10図

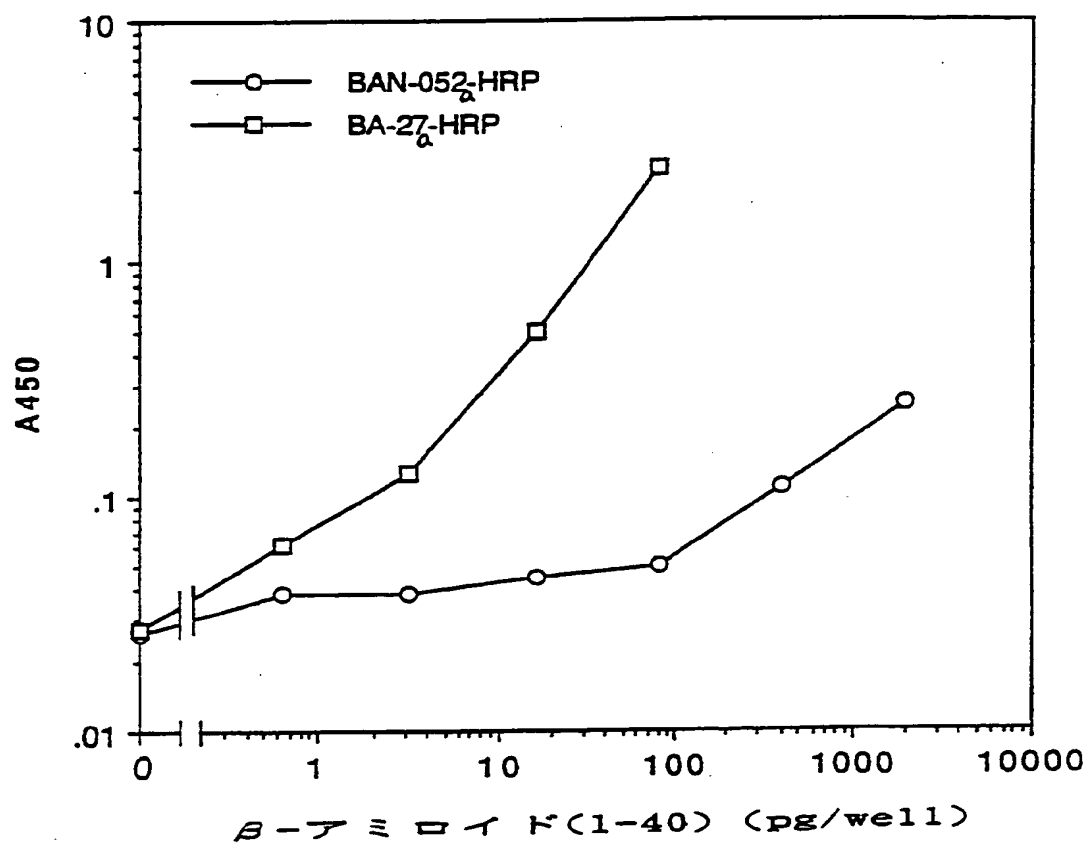


第11図

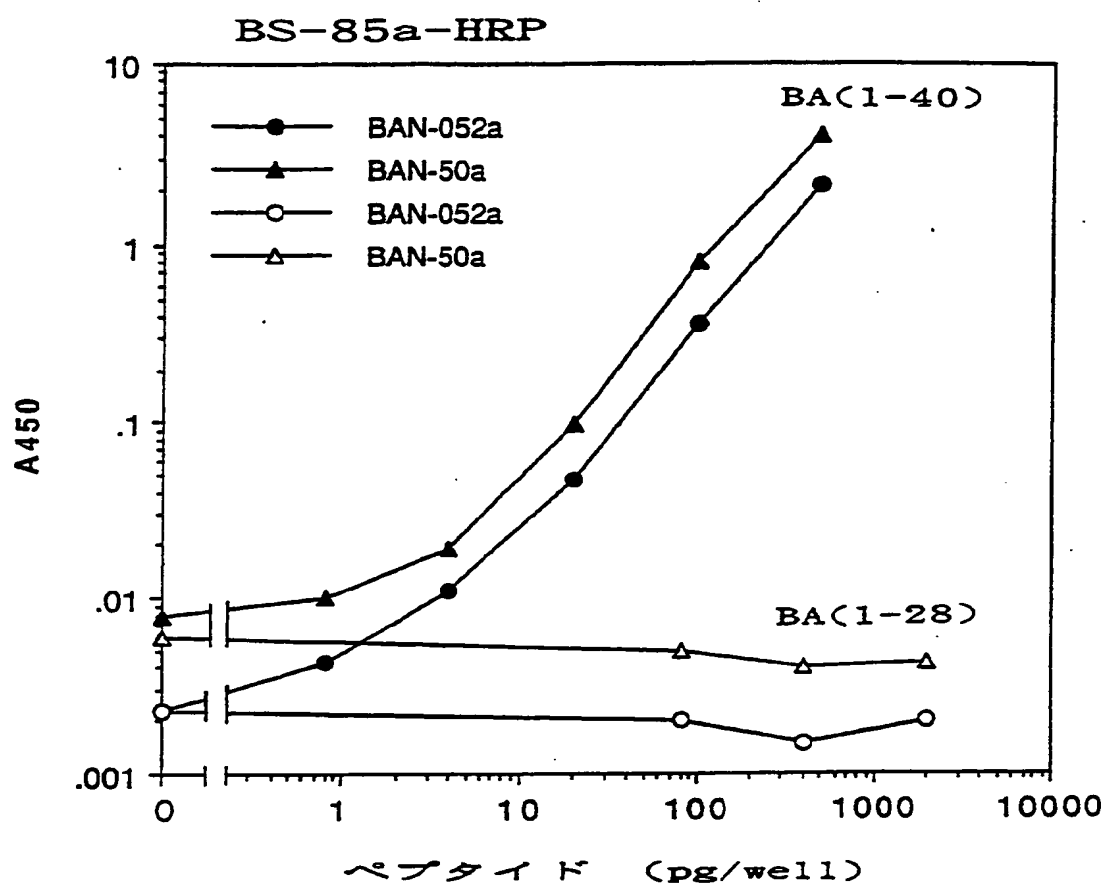
BAN-052a-HRP



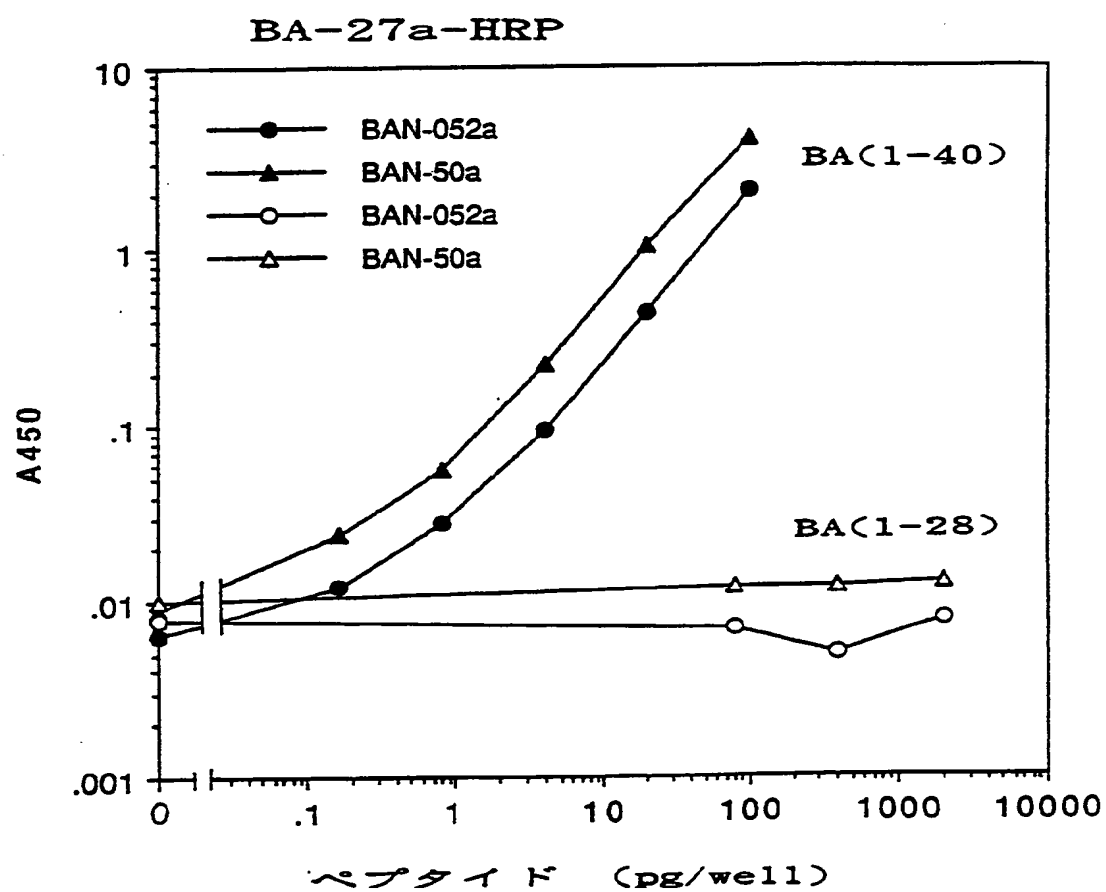
第 1 2 図



第 13 図

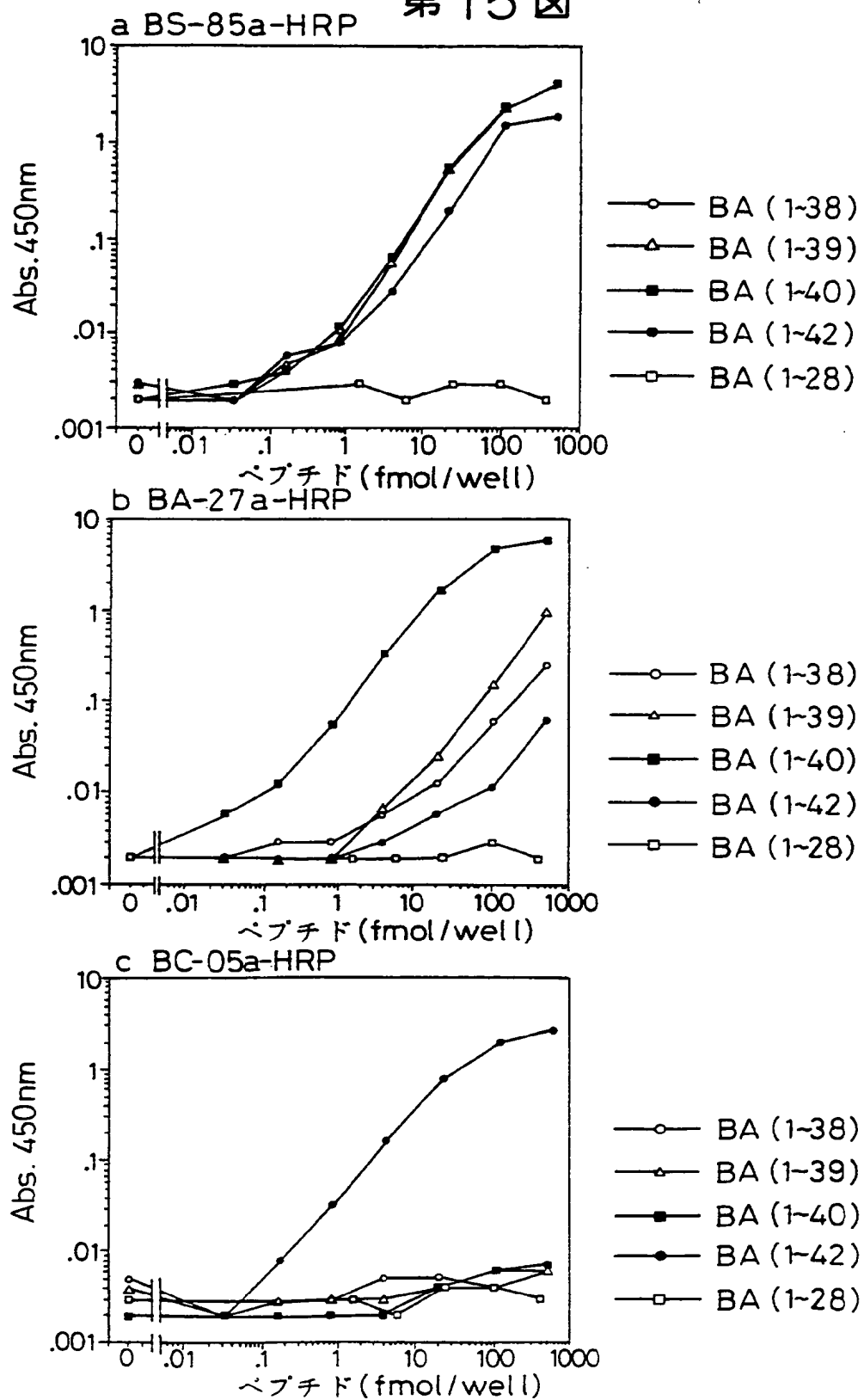


第 1 4 図

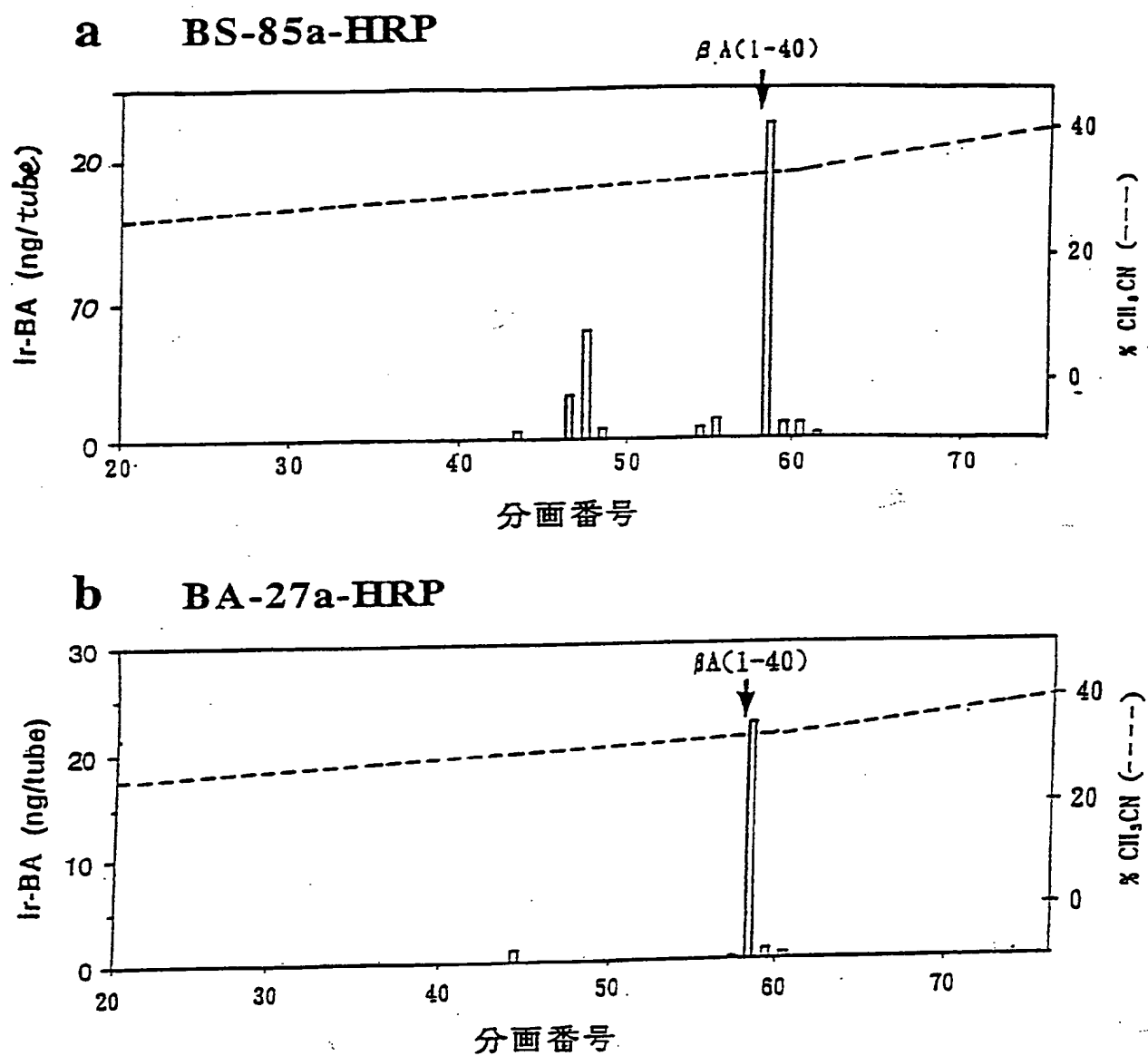




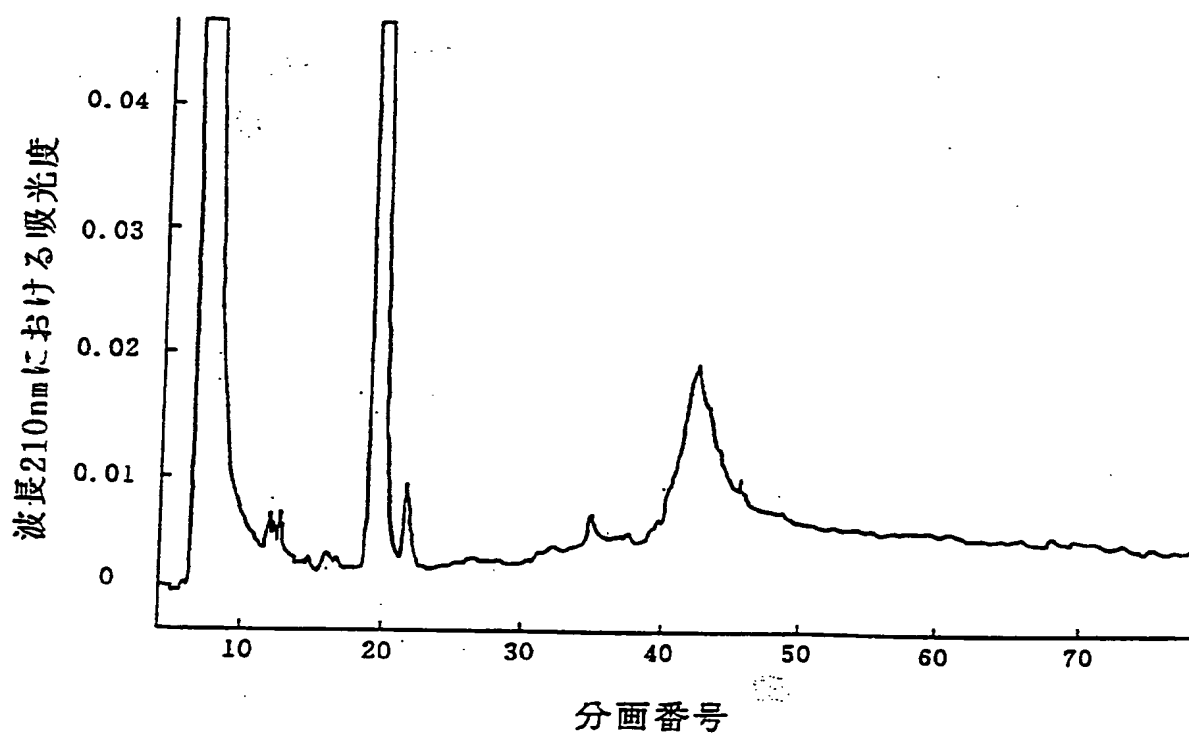
## 第 15 図



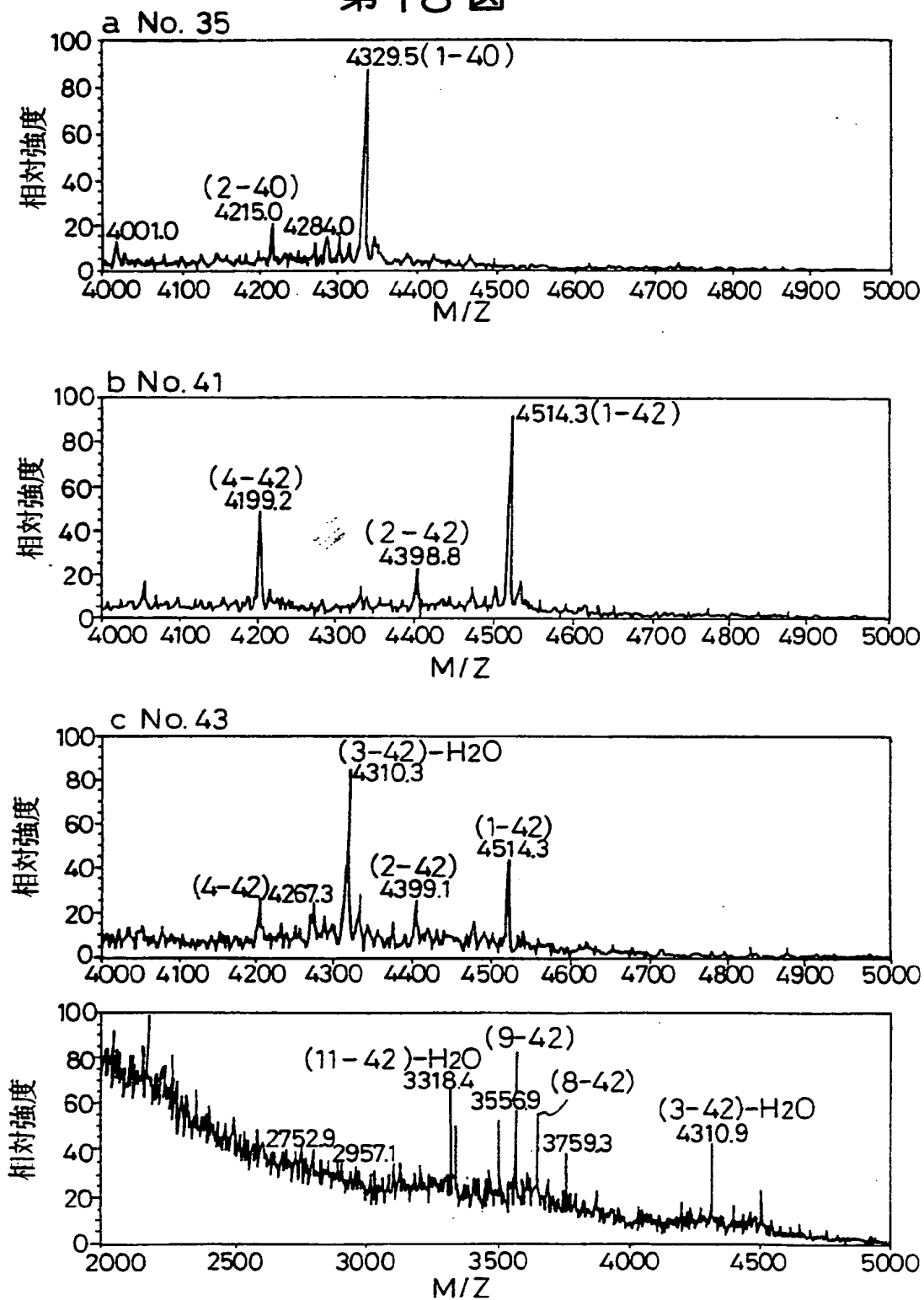
第 16 図



第 1 7 図

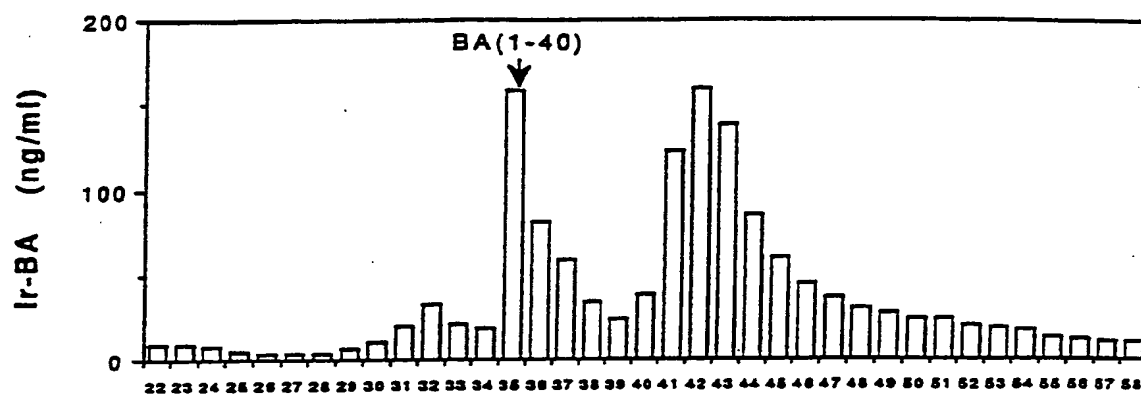


## 第18図

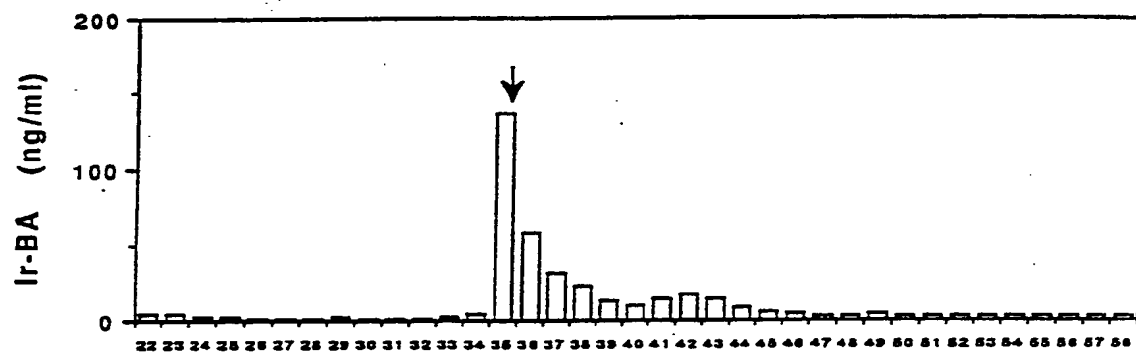


## 第 19 図

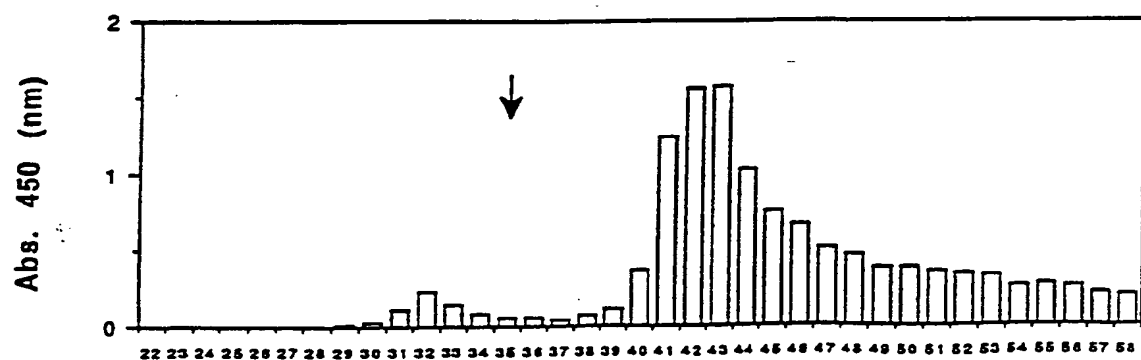
## a BS-85a



## b BA-27a



## c BC-05a



分画番号

## SPECIFICATION

ANTIBODIES TO  $\beta$ -AMYLOIDS OR THEIR DERIVATIVES AND USE  
THEREOF

## 5 Technical Field

The present invention relates to antibodies which are useful and novel in that they have binding specificity to  $\beta$ -amyloids or their derivatives. More particularly, the present invention relates to antibodies useful for the

10 development of assays of  $\beta$ -amyloids or their derivatives based on antigen-antibody reaction, diagnoses of diseases to which  $\beta$ -amyloids or their derivatives are related (for example, Alzheimer's disease), or the development of preventive-therapeutic compositions for Alzheimer's

15 disease.

## Background Art

Senile dementia caused by Alzheimer's disease has raised a serious social problem, and the early

20 establishment of diagnoses and therapeutic methods of Alzheimer's disease has been desired. As lesion characteristic of the brains of patients with Alzheimer's disease, the excessive formation of senile plaques and neurofibrillary tangles have been known. Of these, one of

25 the main constituents of the senile plaque is a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof.

The  $\beta$ -amyloid is a peptide composed of about 40 amino

010788

acids, and is coded in the vicinity of the transmembrane region of an amyloid precursor protein (hereinafter referred to as an APP). Amino acid sequences of the  $\beta$ -amyloids are shown below:

5 [  $\beta$ -Amyloid (1-38)] SEQ ID NO: 1

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-  
His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-  
Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly

[  $\beta$ -Amyloid (1-39)] SEQ ID NO: 2

10 Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-  
His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-  
Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val

[  $\beta$ -Amyloid (1-40)] SEQ ID NO: 3

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-  
15 His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-  
Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

[  $\beta$ -Amyloid (1-41)] SEQ ID NO: 4

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-  
His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-  
20 Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile

[  $\beta$ -Amyloid (1-42)] SEQ ID NO: 5

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-  
His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-  
Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

25 [  $\beta$ -Amyloid (1-43)] SEQ ID NO: 6

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-  
His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-

010795

Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr

According to recent reports, some of the patients with familial Alzheimer's disease belong to families having point mutations on APP, and the possibility has been pointed out that the  $\beta$ -amyloids are one of the causative substances for Alzheimer's disease. Based on such a background, the  $\beta$ -amyloids have been intensively studied as a main subject for the investigation of Alzheimer's disease, and various results of the studies have been presented.

However, assay systems for detecting the  $\beta$ -amyloids easily and with high sensitivity have hitherto been scarcely reported, although deep interest has been expressed in the  $\beta$ -amyloids. The sandwich enzyme immunoassay of the  $\beta$ -amyloids is only reported by P. Seubert et al., [Nature, 359, 325-327 (1992)].

The assay system of P. Seubert et al. is reported to have a detection sensitivity of 100 pg/ml, which is not satisfactory. Further, the assay system is reported to react also with a partial peptide consisting of N-terminal 28 residues [hereinafter refereed to as  $\beta$ -amyloid (1-28)]. However, a number of hydrophobic amino acids exist in C-terminal portions of the  $\beta$ -amyloids,  $\beta$ -amyloid (29-39),  $\beta$ -amyloid (29-40),  $\beta$ -amyloid (29-41),  $\beta$ -amyloid (29-42) or  $\beta$ -amyloid (29-43). This C-terminal region is therefore considered to be embedded in a cell membrane, and is



1010799

assumed to play an important role in aggregation and deposition of peptides. For this reason, it is important to quantify  $\beta$ -amyloids having the C-terminal hydrophobic regions. However, the above-mentioned assay system of P. Seubert et al. does not satisfy the social demands in the specificity and sensitivity.

Usually, antibodies to peptides are prepared by immunizing complexes of the peptides and natural or synthetic polymer carriers. Also in the case of the  $\beta$ -amyloids, the report of P. Seubert et al. described above shows that antibodies reactive to  $\beta$ -amyloid (1-40) can be prepared using N-terminal portions of the  $\beta$ -amyloids which are hydrophilic regions, for example,  $\beta$ -amyloid (1-16), as immunogens. However, it is not clear whether or not an antibody to the C-terminal portion of the  $\beta$ -amyloid which is the hydrophobic region embedded in the cell membrane can be prepared by usual methods. Further, even if the antibody to such a region can be obtained, it does not provide an assurance at all that it reacts with the  $\beta$ -amyloid. Furthermore, if the antibody only shows an extremely low affinity for the  $\beta$ -amyloid, it is generally difficult to expect that, for example, the above-mentioned sandwich enzyme immunoassay of P. Seubert et al. can be established with the antibody. Namely, although various antibodies have hitherto been prepared for the purpose of detecting the  $\beta$ -amyloids, there is no report that the antibody to the C-terminal portion of the  $\beta$ -amyloid has

11.07.95

been prepared and applied to the sandwich enzyme immunoassay, thereby developing an immunoassay by which the  $\beta$ -amyloid can be detected with high sensitivity and specificity without cross reaction with  $\beta$ -amyloid (1-28).

- 5 It is further reported that  $\beta$ -amyloid (25-35) has homology to tachykinin in its amino acid sequence, and has cytotoxicity [B. A. Yankner et al., Science, 250, 279-282 (1990)]. However, there is no report at all that an antibody to  $\beta$ -amyloid (25-35) has been prepared and applied
- 10 to the sandwich enzyme immunoassay, thereby developing an immunoassay by which the  $\beta$ -amyloid can be detected with high sensitivity and specificity without cross reaction with  $\beta$ -amyloid (1-28).

- Recently, it is further reported that, of the  $\beta$ -
- 15 amyloids,  $\beta$ -amyloid (1-42) is mainly deposited in the cerebral cortex (senile plaques), whereas  $\beta$ -amyloid (1-40) is mainly deposited in the cerebral blood vessel (angiopathy) [Arch. Biochem. Biophys., 301, 41-53 (1993)]. It is further suggested that the seed formation of C-
- 20 terminal portion-containing peptides such as  $\beta$ -amyloid (1-42),  $\beta$ -amyloid (26-42),  $\beta$ -amyloid (26-43) and  $\beta$ -amyloid (34-42) causes the deposition of water-soluble  $\beta$ -amyloid (1-40) [Biochemistry, 32, 4693-4697 (1993)]. From such reports, the difference in the deposition manner between  $\beta$ -
- 25 amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42) is considered to be largely related to Alzheimer's disease. When Alzheimer's disease is diagnosed, therefore, sensitive and

41210795

discriminative determination of  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42) is important. However, suitable antibodies for this purpose have not been reported yet.

An object of the present invention is to provide a  
5 novel antibody which can sensitively, specifically  
determine a  $\beta$ -amyloid having a C-terminal hydrophobic  
region or a derivative thereof, preferably a monoclonal  
antibody. Another object of the present invention is to  
provide a method for assaying a  $\beta$ -amyloid or a derivative  
10 thereof with the antibody.

#### Disclosure of Invention

In order to solve the above-mentioned problem, the  
present inventors have conducted intensive investigations.  
15 As a result, the present inventors have prepared a  
plurality of monoclonal antibodies which recognize  
different portions of  $\beta$ -amyloids or derivatives thereof and  
developed an excellent method for assaying  $\beta$ -amyloids by  
the use of the antibodies, followed by further  
20 investigations, thus completing the present invention.

That is, the present invention provides an antibody  
(preferably a monoclonal antibody) specifically reactive to  
a partial peptide on the C-terminal side of a  $\beta$ -amyloid or  
a derivative thereof; a monoclonal antibody specifically  
25 reactive to a partial peptide on the N-terminal side of a  
 $\beta$ -amyloid or a derivative thereof; an antibody (preferably  
a monoclonal antibody) specifically reactive to a partial

11210793

peptide in a central portion of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof; a hybridoma cell producing the monoclonal antibody; methods for producing the antibody and the hybridoma cell; and an immunoassay for a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof by a competitive method or a sandwich method using the antibody (a method for diagnosing Alzheimer's disease, etc.).

More particularly, the present inventors have prepared a plurality of monoclonal antibodies using  $\beta$ -amyloid (25-35),  $\beta$ -amyloid (35-43),  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-16) as immunogens. By combination of the antibodies, the present inventors developed an immunoassay by which  $\beta$ -amyloids or derivatives thereof can be detected with high sensitivity and specificity without cross reaction with  $\beta$ -amyloid (1-28). Namely, using  $\beta$ -amyloid (25-35),  $\beta$ -amyloid (35-43) and  $\beta$ -amyloid (1-40) as immunogens, the present inventors have established monoclonal antibodies which recognize C-terminal portions of  $\beta$ -amyloids or derivatives thereof, for example, antibodies designated BA-27a, BS-85a and BC-05a. Of these, BS-85a and BA-27a each only show an extremely low affinity for the  $\beta$ -amyloids in a competitive immunoassay using labeled  $\beta$ -amyloids. Nevertheless, studies have revealed that combinations of them with two kinds of antibodies selected from monoclonal antibodies to an N-terminal portion ( $\beta$ -amyloid (1-16)) of the  $\beta$ -amyloids, namely antibodies designated BAN-052a and BAN-50a, can provide a sandwich immunoassay with extremely high

42107-95

sensitivity to the  $\beta$ -amyloids. Further, the present inventors have shown that a sandwich immunoassay in which BC-05a is combined with BAN-50a detects the  $\beta$ -amyloids with high sensitivity in a formic acid extract from the brain of  
5 a patient with Alzheimer's disease without cross reaction with  $\beta$ -amyloid (1-40). Furthermore, the present inventors have established monoclonal antibodies which recognize partial peptides in central portions of  $\beta$ -amyloids or derivatives thereof, for example, the antibody designated  
10 BP-90a.

One of the major features of the present invention is to provide sandwich immunoassays which allow highly sensitive and discriminative determination of  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42). Namely, the sandwich immunoassay  
15 in which BA-27a is combined with BAN-052a or BAN-50a can detect  $\beta$ -amyloid (1-40), but can not detect  $\beta$ -amyloid (1-42). Further, the sandwich immunoassay in which BC-05a is combined with BAN-052a or BAN-50a can detect  $\beta$ -amyloid (1-42), but can not detect  $\beta$ -amyloid (1-40). Furthermore, the  
20 sandwich immunoassay in which BS-85a is combined with BAN-052a or BAN-50a can detect  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42). Therefore, according to the sandwich immunoassays in which the monoclonal antibodies of the present invention are combined, highly sensitive and discriminative  
25 quantification of  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42) can be conducted. Such a technique is a surprising finding which can not be deduced from the prior art.

NO: 9

More specifically, the present invention provides:

(1) An antibody specifically reactive to a partial peptide on the C-terminal side of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof;

5 (2) The antibody described in (1), in which said antibody does not recognize a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8 and a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9;

10 (3) The antibody described in (1), in which said antibody recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8, but does not recognize a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9;

15 (4) The antibody described in (1), in which said antibody does not recognize a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8, but recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9;

20 (5) The antibody described in any one of (1) to (4), in which said antibody is a monoclonal antibody;

(6) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (5);

25 (7) A monoclonal antibody indicated by BAN-052a and specifically reactive to a partial peptide on the N-terminal side of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof, in which said antibody recognizes a partial peptide having an

4210795

amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 and/or a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 10;

(8) A monoclonal antibody indicated by BAN-50a and  
5 specifically reactive to a partial peptide on the N-terminal side of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof, in which said antibody recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 and/or a partial peptide having an amino acid sequence represented  
10 by SEQ ID NO: 10;

(9) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (7);

(10) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (8);

15 (11) An antibody specifically reactive to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof, in which said antibody does not recognize a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7, but recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID  
20 NO: 12;

(12) The antibody described in (11), in which said antibody is a monoclonal antibody;

(13) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (12);

25 (14) A method for determining a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof in a test solution which comprises using the antibody described in (1), (7), (8) or (11);

(15) A method for determining a  $\beta$ -amyloid in a test solution which comprises using the antibody described in (1) and the antibody described in (7) or (8);

(16) A method for determining a  $\beta$ -amyloid in a test  
5 solution which comprises using the antibody described in (11) and the antibody described in (1), (7) or (8); and

(17) The method described in any one of (14) to (16), in which said method is used for diagnosis of Alzheimer's disease.

10 Preferred embodiments of (1) described above are as follows:

(18) The antibody described in (1), in which said  $\beta$ -amyloid is a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3,  
15 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6;

(19) The antibody described in (1), in which said derivative of the  $\beta$ -amyloid is a peptide having an amino acid sequence consisting of the 2nd to the 42nd amino acids of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, a  
20 peptide having an amino acid sequence consisting of the 3rd to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, the N-terminal glutamic acid being substituted by pyroglutamic acid, a peptide having an amino acid sequence consisting of the 4th to the 42nd amino  
25 acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, or a peptide having an amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids or the 1st to the 17th amino



NO. 107.95

acids from an amino acid sequence represented by any one of  
SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6;

(20) The antibody described in (1), in which the  
partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid or  
5 the derivative thereof is a partial peptide having an amino  
acid sequence beginning from the 25th or later amino acid  
from the N-terminal amino acid of the  $\beta$ -amyloid;

(21) The antibody described in (1), (18) to (20), in  
which said antibody does not recognize a partial peptide  
10 having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7;

(22) The antibody described in (1), (18) to (21), in  
which said antibody recognizes a partial peptide having an  
amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8; and

(23) The antibody described in (1), (18) to (21), in  
15 which said antibody recognizes a partial peptide having an  
amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9.

Preferred embodiments of (2) described above are as  
follows:

(24) An antibody specifically reactive to a partial  
20 peptide on the C-terminal side of a  $\beta$ -amyloid having an  
amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a  $\beta$ -  
amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID  
NO: 2 and/or a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence  
represented by SEQ ID NO: 3, in which said antibody does  
25 not recognize a partial peptide having an amino acid  
sequence represented by SEQ ID NO: 8 and/or a partial  
peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID

4210795

NO: 9; and

(25) The antibody described in (24), in which said antibody recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.

5 A preferred embodiment of (3) described above is as follows:

(26) An antibody specifically reactive to a partial peptide on the C-terminal side of a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a  $\beta$ -  
10 amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and/or a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, in which  
said antibody recognizes a partial peptide having an amino  
15 acid sequence represented by SEQ ID NO: 8, but does not recognize a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9.

Preferred embodiments of (4) described above are as follows:

20 (27) An antibody specifically reactive to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof contained in a formic acid extract from the brain of a patient with Alzheimer's disease, in which said antibody does not recognize a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8,  
25 but recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9;

(28) The antibody described in (27), in which said  $\beta$ -

424.07.85

amyloid or said derivative thereof contained in the formic acid extract from the brain of the patient with Alzheimer's disease is a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence - represented by SEQ ID NO: 5; and

5       (29) The antibody described in (28), in which said antibody does not recognize a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and a  $\beta$ -amyloid having an amino acid sequence represented  
10 by SEQ ID NO: 3.

Preferred embodiments of (5) described above are as follows:

(30) The monoclonal antibody described in (24) or (25), in which said antibody is indicated by BA-27a;

15       (31) The monoclonal antibody described in (26), in which said antibody is indicated by BS-85a; and

(32) The monoclonal antibody described in (27) to (29), in which said antibody is indicated by BC-05a.

Particularly preferred is

20       (33) The antibody described in any one of (1) to (5) and (18) to (32), in which said antibody is used for determination of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof by a sandwich enzyme immunoassay.

Preferred embodiments of (6) described above are as  
25 follows:

(34) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (30);

4210795

(35) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (31); and

(36) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (32).

5 Preferred embodiments of (7) and (8) described above are as follows:

(37) The monoclonal antibody described in (7) or (8), in which said  $\beta$ -amyloid is a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID  
10 NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6;

(38) The monoclonal antibody described in (7) or (8), in which said derivative of the  $\beta$ -amyloid is a peptide having an amino acid sequence consisting of the 2nd to the 42nd amino acids of an amino acid sequence represented by  
15 SEQ ID NO: 5, a peptide having an amino acid sequence consisting of the 3rd to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, and whose N-terminal glutamic acid being substituted by pyroglutamic acid, or a peptide having an amino acid sequence consisting  
20 of the 4th to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5; and

(39) The antibody described in any one of (7), (8), (37) or (38), in which said antibody is used for determination of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof by a  
25 sandwich enzyme immunoassay.

Preferred embodiments of (11) described above are as follows:

421.07.95

- 16 -

(40) The antibody described in (11), in which said  $\beta$ -amyloid is a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6;

5 (41) The antibody described in (11), in which said derivative of the  $\beta$ -amyloid is a peptide having an amino acid sequence consisting of the 2nd to the 42nd amino acids of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, a peptide having an amino acid sequence consisting of the 3rd  
10 to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, and whose N-terminal glutamic acid being substituted by pyroglutamic acid, a peptide having an amino acid sequence consisting of the 4th to the  
15 SEQ ID NO: 5, or a peptide having an amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids or the 1st to the 17th amino acids from an amino acid sequence represented by any one of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6;

(42) The antibody described in (11), in which said  $\beta$ -  
20 amyloid or said derivative thereof is a peptide having an amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids or the 1st to the 17th amino acids from an amino acid sequence represented by any one of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6;

25 (43) The antibody described in (11), in which said  $\beta$ -amyloid or said derivative thereof is a peptide having an amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids

4210795

- 17 -

or the 1st to the 17th amino acids from an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3;

(44) The antibody described in (11), (40) or (43), in which said antibody recognizes a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 11; and

(45) The antibody described in (11), (40) or (43), in which said antibody is used for determination of a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof by a sandwich enzyme immunoassay.

10 A preferred embodiment of (12) described above is as follows:

(46) The monoclonal antibody described in (12), in which said antibody is indicated by BP-90a.

A preferred embodiment of (13) described above is as follows:

(47) A hybridoma cell producing the monoclonal antibody described in (46).

A preferred embodiment of (14) described above is as follows:

20 (48) A method for determining a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof in a test solution which comprises competitively reacting the antibody described in (1), (7), (8) or (11) with the test solution and a labeled  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof, and measuring the ratio of the  
25 labeled  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof bound to said antibody.

Preferred embodiments of (15) described above are as

follows:

(49) A method for determining a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof in a test solution which comprises- reacting an antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof  
5 insolubilized on a carrier, a labeled antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof and the test solution with one another, and then, measuring the activity of a labeling agent on the carrier, one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof insolubilized on the carrier and  
10 the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof being the antibody described in (1), and the other being an antibody which recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 10;

15 (50) The determining method described in (49), in which the antibody which recognizes the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 10 is a monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a;

20 (51) The determining method described in (49), in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BA-27a, BS-85a or BC-05a, and the other is a monoclonal antibody indicated by BAN-  
25 052a or BAN-50a;

(52) The determining method described in (49), in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on

11.21.07.95

- 19 -

the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BA-27a, the other is a monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is a peptide having  
5 an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and/or a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5;

10 (53) The determining method described in (49), in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BS-85a, the other is a monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and  
15 the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and/or a peptide having an amino acid  
20 sequence represented by SEQ ID NO: 5; and

(54) The determining method described in (49), in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BC-05a, the other is a  
25 monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.



4210795

Preferred embodiments of (16) described above are as follows:

(55) A method for determining a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof in a test solution which comprises  
5 reacting an antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof insolubilized on a carrier, a labeled antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof and the test solution with one another, and then, measuring the activity of a labeling agent on the carrier, one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid  
10 or the derivative thereof insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof being the antibody described in (11), and the other being the antibody described in (1) or an antibody which recognizes a partial peptide having an amino acid sequence  
15 represented by SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 10;

(56) The determining method described in (55), in which the antibody which recognizes the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 10 is a monoclonal antibody indicated by BAN-  
20 052a or BAN-50a;

(57) The determining method described in (55), in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BP-90a, and the other is a  
25 monoclonal antibody indicated by BA-27a, BS-85a, BC-05a, BAN-052a or BAN-50a;

(58) The determining method described in (55), in

4210795

- 21 -

which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BP-90a, the other is a monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and  
5 the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, a peptide having an amino acid sequence  
10 represented by SEQ ID NO: 4, a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 and/or a peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6; and

(59) The determining method described in (55), in  
15 which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is a monoclonal antibody indicated by BP-90a, the other is a monoclonal antibody indicated by BA-27a, BS-85a or BC-05a, and the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is a peptide  
20 having an amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids or the 1st to the 17th amino acids from an amino acid sequence represented by any one of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6.

Of the anti- $\beta$ -amyloid antibody-producing hybridomas  
25 obtained by the present invention, BAN-052, BA-27 and BS-85 were deposited with the Institute for Fermentation, Osaka, Japan (IFO) under the following accession numbers on

12.07.93

December 22, 1992, and with the National Institute of Bioscience and Human-technology, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, Japan (NIBH) under the following accession  
5 numbers on January 7, 1993.

<u>Hybridoma</u>	<u>IFO</u>	<u>FERM-BP (NIBH)</u>
BAN-052	50386	4138
BA-27	50387	4139
BS-85	50388	4140

10 Further, of the hybridoma cells obtained by the present invention, BAN-50 was deposited with the Institute for Fermentation, Osaka, Japan (IFO) under the following accession number on January 8, 1993, and with the National  
15 Institute of Bioscience and Human-technology, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, Japan (NIBH) under the following accession number on January 27, 1993.

<u>Hybridoma</u>	<u>IFO</u>	<u>FERM-BP (NIBH)</u>
BAN-50	50390	4163

20 Furthermore, of the hybridoma cells obtained by the present invention, BC-05 and BP-90 were deposited with the National Institute of Bioscience and Human-technology, the Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry, Japan (NIBH) under the  
25 following accession numbers on November 2, 1993.

<u>Hybridoma</u>	<u>FERM-BP (NIBH)</u>
BC-05	4457

0210795

BP-90

4458

The antibody obtained from each hybridomas represented by attaching the suffix "a" to the hybridoma name.

Of the SEQ ID NOs used in this specification, SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 12 indicate amino acid sequences of the following peptides:

- [SEQ ID NO: 1]  $\beta$ -Amyloid (1-38)
- [SEQ ID NO: 2]  $\beta$ -Amyloid (1-39)
- [SEQ ID NO: 3]  $\beta$ -Amyloid (1-40)
- 10 [SEQ ID NO: 4]  $\beta$ -Amyloid (1-41)
- [SEQ ID NO: 5]  $\beta$ -Amyloid (1-42)
- [SEQ ID NO: 6]  $\beta$ -Amyloid (1-43)
- [SEQ ID NO: 7]  $\beta$ -Amyloid (1-28)
- [SEQ ID NO: 8]  $\beta$ -Amyloid (25-35)
- 15 [SEQ ID NO: 9]  $\beta$ -Amyloid (35-43)
- [SEQ ID NO: 10]  $\beta$ -Amyloid (1-16)
- [SEQ ID NO: 11]  $\beta$ -Amyloid (17-28)
- [SEQ ID NO: 12]  $\beta$ -Amyloid (18-28)

The  $\beta$ -amyloids used in the present invention include

20  $\beta$ -amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1,  $\beta$ -amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2,  $\beta$ -amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3,  $\beta$ -amyloid (1-41) having the amino acid sequence represented

25 by SEQ ID NO: 4,  $\beta$ -amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, and  $\beta$ -amyloid (1-43) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6.

0210795  
- 24 -

The derivatives of the  $\beta$ -amyloids used in the present invention include peptides each lacking about 1 to 17 amino acid residues from the N-terminal portions of the above-mentioned  $\beta$ -amyloids, peptides in which L-aspartic acid of  
5 the above-mentioned  $\beta$ -amyloids is isomerized to L-isoaspartic acid, D-isoaspartic acid or D-aspartic acid, and peptides in which the N-terminal portions of the above-mentioned  $\beta$ -amyloids have pyroglutamic acid. Examples thereof include the peptide having the amino acid sequence  
10 consisting of the 2nd to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, the peptide having the amino acid sequence consisting of the 3rd to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by  
SEQ ID NO: 5 and the N-terminal glutamic acid being  
15 substituted by pyroglutamic acid, the peptide having the amino acid sequence consisting of the 4th to the 42nd amino acids of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, and the peptide having the amino acid sequence lacking  
the 1st to the 16th amino acids or the 1st to the 17th  
20 amino acids from the amino acid sequence represented by any one of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6 (for example,  $\beta$ -amyloid (17-40) or  $\beta$ -amyloid (18-40)). These  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof can be prepared, for example, from mammals such as humans, monkeys, rats and mice by methods  
25 which are per se known, and may also be purified natural samples which are commercially available.

Examples of the partial peptides on the C-terminal

sides of the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof include the partial peptides having the amino acid sequences each beginning from the 25th or later amino acids from the N-terminal amino acids of the  $\beta$ -amyloids.

5           Examples of the antibodies (preferably the monoclonal antibodies) specifically reactive to the partial peptides on the C-terminal sides of the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof include the antibodies which recognize the partial peptides or the derivatives thereof, but do not  
10 recognize the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 (namely, the partial peptide on the N-terminal sides of the  $\beta$ -amyloids, which is represented by  $\beta$ -amyloid (1-28)). More specifically, of these antibodies, the following antibodies are preferred:

15           (i) The antibodies which do not recognize the partial peptides each having the amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 8 and SEQ ID NO: 9 (namely,  $\beta$ -amyloid (25-35) and  $\beta$ -amyloid (35-43));

          (ii) The antibodies which recognize the partial  
20 peptide having the amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 8 (namely,  $\beta$ -amyloid (25-35)), and more preferably the antibodies which recognize the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8 (namely  $\beta$ -amyloid (25-35)), but do not recognize the partial  
25 peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9 (namely  $\beta$ -amyloid (35-43)); and

          (iii) The antibodies which recognize the partial

0210795  
- 26 -

peptide having the amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 9 (namely,  $\beta$ -amyloid (35-43)), and more preferably the antibodies which do not recognize the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8  
5 (namely  $\beta$ -amyloid (25-35)), but recognize the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9 (namely  $\beta$ -amyloid (35-43)).

Of the antibodies of (i) described above, the antibodies are preferred which particularly recognize  $\beta$ -  
10 amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1,  $\beta$ -amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and/or  $\beta$ -amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3. Further, the antibodies are preferred which  
15 recognize  $\beta$ -amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1,  $\beta$ -amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2,  $\beta$ -amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and  $\beta$ -amyloid (1-42) having the amino acid sequence  
20 represented by SEQ ID NO: 5.

Of the antibodies of (ii) described above, the antibodies are preferred which particularly recognize  $\beta$ -amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1,  $\beta$ -amyloid (1-39) having the amino acid  
25 sequence represented by SEQ ID NO: 2,  $\beta$ -amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and/or  $\beta$ -amyloid (1-42) having the amino acid sequence

021.07.95  
- 27 -

represented by SEQ ID NO: 5.

Further, of the antibodies of (iii) described above, the antibodies are preferred which particularly recognize the  $\beta$ -amyloids contained in the formic acid extracts from the brains of the patients with Alzheimer's disease (particularly,  $\beta$ -amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5). Furthermore, the antibodies are preferred which recognize  $\beta$ -amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, but do not recognize  $\beta$ -amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1,  $\beta$ -amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and  $\beta$ -amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3.

Typical examples of the antibodies of (i) described above include the monoclonal antibody indicated by BA-27a, typical examples of the antibodies of (ii) described above include the monoclonal antibody indicated by BS-85a, and typical examples of the antibodies of (iii) described above include the monoclonal antibodies indicated by BC-05a, BC-15a, BC-65a, BC-75a and BC-55a (particularly, BC-05a is preferred).

Then, the monoclonal antibodies specifically reactive to the partial peptides on the N-terminal sides of the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof used in the present invention include, for example, the monoclonal antibodies which recognize the partial peptide having the amino acid



sequence represented by SEQ ID NO: 7 ( $\beta$ -amyloid (1-28)) and/or the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 10 ( $\beta$ -amyloid (1-16)).

Specifically, the monoclonal antibodies indicated by BAN-50a, BAN-052a, BAN-11a, BAN-30a, BAN-20a and BAN-40a are shown, and particularly, the monoclonal antibodies indicated by BAN-052a and BAN-50a are preferred.

Further, the monoclonal antibodies specifically reactive to the partial peptides in the central portions of the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof used in the present invention include, for example, the antibodies (preferably, the monoclonal antibodies) which do not recognize the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 and recognize the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 12. Of these antibodies, the antibodies are preferred which particularly recognize the peptides having the amino acid sequences each lacking the 1st to the 16th amino acids or the 1st to the 17th amino acids from the amino acid sequences represented by any one of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6. In particular, the antibodies are preferred which particularly recognize the peptide having the amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 (the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11) or the peptide having the amino acid sequence lacking the 1st to the 17th amino acids therefrom (the amino acid sequence of

SEQ ID NO: 12). Specifically, the monoclonal antibodies indicated by BP-01a, BP-02a, BP-03a and BP-90a are used. Of these monoclonal antibodies, BP-03a and BP-90a can also recognize the partial peptide having the amino acid  
5 sequence indicated by SEQ ID NO: 11. Of these monoclonal antibodies, BP-90a is particularly suitable.

Methods of preparing the antigens and methods of preparing the monoclonal antibodies are explained below in detail.

#### 10 (1) Preparation of Antigens

As antigens used for preparing the antibodies of the present invention, for example, any of the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof, partial peptides obtained by hydrolyzing the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof and  
15 synthetic peptides having one or more kinds of antigenic determinants which are the same as those of the  $\beta$ -amyloids can be used (these are hereinafter also briefly referred to as  $\beta$ -amyloid antigens).

As the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof, the  
20 above-mentioned ones are used. These  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof can be prepared, for example, from mammals such as humans, monkeys, rats and mice by methods which are per se known, and may also be purified natural samples which are commercially available.

25 Examples of the partial peptides obtained by hydrolyzing the  $\beta$ -amyloids include partial peptides obtained by hydrolyzing  $\beta$ -amyloid (1-43) having the amino

acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 successively from the N-terminus and/or the C-terminus with exoproteases such as aminopeptidase and carboxypeptidase or mixtures thereof, and partial peptides obtained by hydrolyzing  $\beta$ -amyloid (1-  
5 43) with various endopeptidases or mixtures thereof. When  $\beta$ -amyloid (1-42) is prepared by this method, the sample is contaminated with  $\beta$ -amyloid (1-41) and/or  $\beta$ -amyloid (1-43) in some cases.

Examples of the synthetic peptides used in the present  
10 invention include peptides having the same structure as the above-mentioned purified natural  $\beta$ -amyloid antigens, and peptides having one or more kinds of amino acid sequences which are the same as those of any portions consisting of at least 3 amino acids, preferably at least 6 amino acids  
15 in the amino acid sequences of  $\beta$ -amyloid (1-43), etc. (hereinafter briefly referred to as  $\beta$ -amyloid-relating synthetic peptides).

The above-mentioned synthetic peptides can be produced by methods known in the art, which may be either solid  
20 phase synthesis methods or liquid phase synthesis methods. Examples of such methods for peptide synthesis include methods described in B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963); M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966);  
25 Schroder and Lubke, The Peptide, Academic Press, New York, (1965); N. Izumiya et al., Peptide Gosei no Kiso to Jikken (Fundamentals and Experiments of Peptide Synthesis),

Maruzen (1985); and H. Yazima and S. Sakakibara, Seikagaku Jikken Koza 1 (Course of Biochemical Experiments 1), Chemistry of Proteins IV, 205 (1977). For example, when the  $\beta$ -amyloids or the  $\beta$ -amyloid-relating synthetic peptides  
5 are synthesized by the solid methods, any resins known in the art as insoluble resins (such as chloromethyl resins and 4-oxymethylphenylacetamidomethyl resins) are used for a successive condensation of protected amino acids to the C-terminal sides of the  $\beta$ -amyloids or the  $\beta$ -amyloid-relating  
10 synthetic peptides according to usual methods. Then, all the protective groups are removed by hydrogen fluoride treatment, followed by purification by methods which are per se known, such as high performance liquid chromatography. Thus, the desired  $\beta$ -amyloids or  $\beta$ -amyloid-  
15 relating synthetic peptides can be obtained.

N-protected amino acids can be produced by the methods of protecting the  $\alpha$ -amino groups with Boc groups; further, for example, the hydroxyl groups of serine and threonine with Bzl groups; the  $\omega$ -carboxylic acid groups of glutamic  
20 acid and aspartic acid with OBzl groups; the  $\epsilon$ -amino group of lysine with a Cl-Z group; the guanido group of arginine with a Tos group; and the imidazole group of histidine with a Bom group.

When amino acids and so on are indicated by  
25 abbreviations in the specification of this invention, the abbreviations adopted by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature or commonly used in the art are

0210795  
- 32 -

employed. For example, the following abbreviations are used. When the amino acids are capable of existing as optical isomers, it is understood that the L-forms are represented unless otherwise specified.

5	PAM	: Phenylacetamidomethyl
	Boc	: t-Butyloxycarbonyl
	Cl-Z	: 2-Chloro-benzyloxycarbonyl
	Br-Z	: 2-Bromo-benzyloxycarbonyl
	Bzl	: Benzyl
10	OC <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	: Cyclohexyl ester
	OBzl	: Benzyl ester
	Tos	: p-Toluenesulfonyl
	HOBt	: 1-Benzotriazole
	MeBzl	: 4-Methylbenzyl
15	Bom	: Benzyloxymethyl
	DCC	: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
	Gly	: Glycine
	Ala	: Alanine
	Val	: Valine
20	Leu	: Leucine
	Ile	: Isoleucine
	Ser	: Serine
	Thr	: Threonine
	Cys	: Cysteine
25	Met	: Methionine
	Glu	: Glutamic acid
	Asp	: Aspartic acid

04.21.07.98  
- 33 -

Lys : Lysine  
Arg : Arginine  
His : Histidine  
Phe : Phenylalanine  
5 Tyr : Tyrosine  
Trp : Tryptophan  
Pro : Proline  
Asn : Asparagine  
Gln : Glutamine

10 Because the  $\beta$ -amyloid antigens aggregate easily,  
insolubilized ones can also be directly immunized.  
Further, complexes in which the  $\beta$ -amyloid antigens are  
bound to or adsorbed by appropriate carriers may also be  
immunized. For the carriers and the mixing ratio of the  
15 carriers to the  $\beta$ -amyloid antigens (haptens), the antigens  
may be bound to or adsorbed by any carriers at any ratio,  
as long as antibodies effectively raised to the  $\beta$ -amyloid  
antigens bound to or adsorbed by the carriers. Complexes  
can be used in which the hapten antigens are bound to or  
20 adsorbed by natural or synthetic polymer carriers which are  
usually used in preparing antibodies to the hapten antigens  
at a weight ratio of 0.1-100 based on 1 of hapten. The  
natural polymer carriers include, for example, serum  
albumin of mammals such as bovine, rabbits and human,  
25 thyroglobulin of mammals such as bovine and rabbits,  
hemoglobin of mammals such as bovine, rabbits, human and  
sheep, and keyhole limpet hemocyanin. Examples of the

synthetic polymer carriers which can be used include various latexes of polymers or copolymers such as amino acid polymers, styrene polymers, acrylic polymers, vinyl polymers and propylene polymers.

5 In addition, various condensing agents can be used for coupling of the haptens and the carriers. Examples of the condensation agents which are conveniently used include diazonium compounds such as bis-diazotized benzidine which crosslinks tyrosine, histidine and tryptophan; dialdehyde  
10 compounds such as glutaraldehyde which crosslinks amino groups together; diisocyanate compounds such as toluene-2,4-diisocyanate; dimaleimide compounds such as N,N'-o-phenylenedimaleimide which crosslinks thiol groups together; maleimide active ester compounds which crosslink  
15 amino groups and thiol groups; and carbodiimide compounds crosslinking amino groups and carboxyl groups. When amino groups are crosslinked together, there is another way in which an active ester reagent (for example, SPDP) having a dithiopyridyl group is reacted with one amino acid,  
20 followed by reduction to introduce a thiol group, whereas a maleimide group is introduced into the other amino group by the use of a maleimide active ester reagent, and then, both can be reacted with each other.

## (2) Preparation of Monoclonal Antibodies

25 The  $\beta$ -amyloid antigens are given alone or together with carriers and diluents to warm-blooded animals at antibody-producible sites, for example, by intraperitoneal,

44107-95  
- 35 -

intravenous and subcutaneous injections. When the  $\beta$ -amyloid antigens are given, Freund's complete adjuvant or Freund's incomplete adjuvant may be given to enhance antibody producing ability. The dosing is usually carried out once every 2 to 6 weeks, totally 2 to 10 times. The warm-blooded animals include, for example, monkeys, rabbits, dogs, guinea pigs, mice, rats, sheep, goat and chickens. For preparation of the monoclonal antibodies, mice and rats are preferably used.

10 In preparing the monoclonal antibodies, individuals showing a high antibody titer are selected from the warm-blooded animals, for example, mice, immunized with the  $\beta$ -amyloid antigens. After 2 to 5 days from the final immunization, the spleens or the lymph nodes are  
15 collected therefrom, and antibody-producing cells contained therein are fused with myeloma cells, whereby anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody-producing hybridomas can be prepared. The anti- $\beta$ -amyloid antibody titer in the serum is determined, for example, by reacting a labeled  $\beta$ -amyloid  
20 described below with an antiserum, and then assaying the activity of an labeling agent bound to the antibody. The fusing procedure can be conducted according to methods known in the art, for example, the method of Köhler and Milstein [Nature, 256, 495 (1975)]. Fusion accelerators,  
25 including polyethylene glycol (PEG) and Sendai virus, may be used. In particular, PEG is preferably used. Examples of the myeloma cells include NS-1, P3U1, SP2/0 and AP-1,



0210795  
- 36 -

and P3U1 is preferably used. The ratio of the antibody-producing cells (spleen cells) to be used to the myeloma cells is preferably about 1:1 to 20:1. PEG (preferably PEG 1,000 to PEG 6,000) can be added in a concentration of  
5 about 10 to 80%, followed by incubation at 20 to 40°C, preferably 30 to 37°C, for 1 to 10 minutes, thereby effectively performing cell fusion.

Various methods can be used for screening the anti- $\beta$ -amyloid antibody-producing hybridomas. Examples of such  
10 methods include a method comprising adding a hybridoma culture supernatant to a solid phase (for example, a microplate) by which a  $\beta$ -amyloid or a  $\beta$ -amyloid-relating synthetic peptide is allowed to be adsorbed directly or together with a carrier, and then, adding an anti-  
15 immunoglobulin antibody (when a mouse cell is used for cell fusion, an anti-mouse immunoglobulin antibody is used) or protein A labeled with a radioactive material or an enzyme to detect an anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody bound to the solid phase; and a method comprising adding a hybridoma  
20 culture supernatant to a solid phase by which an anti-immunoglobulin antibody or Protein A is allowed to be adsorbed, and adding a  $\beta$ -amyloid labeled with a radioactive material or an enzyme to detect an anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody bound to the solid phase. Selection  
25 and breeding of the anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody are usually conducted in a medium for animal cells supplemented with 10-20% fetal calf serum (for example, RPMI 1640), to

which HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) is added. The antibody titer of the hybridoma culture supernatant can be assayed in a manner similar to the above-mentioned assay of the anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody in the anti-serum.

Separation and purification of the anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibodies are carried out similarly to usual separation and purification of polyclonal antibodies according to separating and purifying methods of immunoglobulin [for example, salt precipitation, alcohol precipitation, isoelectric precipitation, electrophoresis, adsorption and desorption with ion exchange materials (for example, DEAE), ultracentrifugation, gel filtration and specific purification in which only the antibodies are collected with active adsorbing agents such as antigen-binding solid phases, protein A and protein G].

Further, the hybridoma producing the anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody reactive to a partial region of the  $\beta$ -amyloid and the hybridoma producing the anti- $\beta$ -amyloid monoclonal antibody reactive to the  $\beta$ -amyloid, but unreactive to a partial region thereof can be selected, for example, by assaying the binding property of a peptide corresponding to the partial region and an antibody produced by the hybridoma.

The antibody of the present invention thus obtained which is specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid or the derivative

thereof; the monoclonal antibody indicated by BAN-052a; the monoclonal antibody indicated by BAN-50a; and the antibody specifically reactive to the partial peptide in the central portion of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof can each  
 5 specifically recognize the partial peptides on the N-terminal and C-terminal sides and in the central portion of the  $\beta$ -amyloid. They can be therefore used for determination of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof in a test solution, particularly determination by the sandwich  
 10 immunoassay.

Namely, the present invention provide:

(1) a method for determining a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof in a test solution which comprises competitively reacting an antibody of the present invention  
 15 to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof with the test solution and a labeled  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof, and measuring the ratio of the labeled  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof bound to said antibody;

(2) a method for determining a  $\beta$ -amyloid or a  
 20 derivative thereof in a test solution which comprises reacting an antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof insolubilized on a carrier, a labeled antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof and the test solution with one another, and then, measuring the activity of a labeling  
 25 agent on the carrier, in the method, one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or

NO. 2107-35

the derivative thereof being an antibody specifically reactive to a partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof, and the other being an antibody which recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 (namely,  $\beta$ -amyloid (1-28)) and/or a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 10 (namely,  $\beta$ -amyloid (1-16)); and

(3) a method for determining a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof in a test solution which comprises reacting an antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof insolubilized on a carrier, a labeled antibody to a  $\beta$ -amyloid or a derivative thereof and the test solution with one another, and then, measuring the activity of a labeling agent on the carrier, in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof being an antibody specifically reactive to a partial peptide in a central portion of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof, and the other being an antibody which recognizes a partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof or an antibody which recognizes a partial peptide having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 10.

More specifically, the antibody specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is the monoclonal

11-107-95  
- 40 -

antibody indicated by BA-27a, BS-85a or BC-05a, the antibody which recognizes the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 (namely,  $\beta$ -amyloid (1-28)) and/or the partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 10 (namely,  $\beta$ -amyloid (1-16)) is the monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the antibody specifically reactive to the partial peptide in the central portion of the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is the antibody indicated by BP-90a.

Particularly preferred examples of the above-mentioned determining methods (2) include:

a determining method in which one of the antibodies to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is the monoclonal antibody indicated by BA-27a, the other is the monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the  $\beta$ -amyloid is the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4;

a determining method in which one of the antibodies to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is the monoclonal antibody indicated by BS-85a, the other is the monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the  $\beta$ -amyloid is the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1,

41  
1010795

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5; and

a determining method in which one of the antibodies to the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof insolubilized-on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid or  
5 the derivative thereof is the monoclonal antibody indicated by BC-05a, the other is the monoclonal antibody indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the  $\beta$ -amyloid is the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.

Particularly preferred examples of the above-mentioned  
10 determining methods (3) include:

a determining method in which one of the antibodies to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is the monoclonal antibody  
indicated by BP-90a, the other is the monoclonal antibody  
15 indicated by BAN-052a or BAN-50a, and the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ  
20 ID NO: 3, the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4, the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 and/or the peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6; and

25 a determining method in which one of the antibody to the  $\beta$ -amyloid insolubilized on the carrier and the labeled antibody to the  $\beta$ -amyloid is the monoclonal antibody

42

indicated by BP-90a, the other is the monoclonal antibody indicated by BA-27a, BS-85a or BC-05a, and the  $\beta$ -amyloid or the derivative thereof is the peptide having the amino acid sequence lacking the 1st to the 16th amino acids or the 1st  
5 to the 17th amino acids from the amino acid sequence represented by any of SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6.

The determining methods (immunoassays) of the  $\beta$ -amyloids or the derivatives thereof (hereinafter briefly referred to as the " $\beta$ -amyloids") of the present invention  
10 are described in more detail below.

The antibodies of the present invention can recognize the  $\beta$ -amyloids, so that the assay or the detection by tissue staining of the  $\beta$ -amyloids can be conducted. For these purposes, either the antibodies themselves or  
15  $F(ab')_2$ , Fab' or Fab fractions of antibody molecules may be used. The measuring methods using the antibodies of the present invention are not particularly limited. Any measuring method may be used, as long as the amount of the antibodies, the antigens or the antibody-antigen complexes  
20 corresponding to the amount of the antigens (for example, the amount of the  $\beta$ -amyloids) in solutions to be measured is detected by chemical or physical means, and calculated from standard curves prepared by the use of standard solutions containing the antigens in known amounts. For  
25 example, nephelometry, competitive methods, immunometric methods and sandwich methods are suitably used. With respect to sensitivity and specificity, it is particularly

preferred to use the sandwich methods described below.

In measuring methods using labeling substances, radioisotopes, enzymes, fluorescent substances, luminous substances, etc. are used as labeling agents. Examples of the radioisotopes include  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$ . As the above-mentioned enzymes, it is preferred that they are stable and have a high specific activity. Examples thereof include  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase, alkaline phosphatase, peroxidase and malate dehydrogenase. Examples of the fluorescent substances include fluorescamine and fluorescein isothiocyanate. The luminous substances include, for example, luminol, luminol derivatives, luciferin and lucigenin. Further, biotin-avidin systems can also be used for binding of the antibodies or the  $\beta$ -amyloids with the labeling agents.

When the antigens or the antibodies are insolubilized, either physical adsorption or chemical binding usually used for insolubilization or fixation of proteins or enzymes may be employed. Examples of the carriers include insoluble polysaccharides such as agarose, dextran and cellulose, synthetic resins such as polystyrene, polyacrylamide and silicone polymers, and glass.

In the sandwich methods, the test solutions are reacted with the insolubilized anti- $\beta$ -amyloid antibodies (the first reaction), further, the labeled anti- $\beta$ -amyloid antibodies are reacted (the second reaction), and then, the activity of the labeling agents on the insolubilized



carriers is assayed, whereby the amount of the  $\beta$ -amyloids in the test solutions can be determined. The first reaction and the second reaction may be conducted simultaneously or sequentially. The labeling agents and the insolubilizing methods can be used in accordance with those described above. Further, in the immunoassays by the sandwich methods, the antibodies used as the antibodies for solid phases or the antibodies for labeling are not necessarily of one kind, but two or more kinds of antibodies may be used as mixtures for the purpose of enhancing the measuring sensitivity, etc.

In the methods of the present invention for measuring the  $\beta$ -amyloids by the sandwich methods, the anti- $\beta$ -amyloid antibodies used in the first reaction are preferably different from those used in the second reaction in sites at which the antibodies bound to the  $\beta$ -amyloids. For example, when the antibody used in the first reaction recognizes the partial peptide on the N-terminal side of the  $\beta$ -amyloid, the antibody used in the second reaction is preferably an antibody which recognizes a partial peptide other than the partial peptide on the N-terminal side (namely, the partial peptide on the C-terminal side).

Specifically, of monoclonal antibodies prepared using  $\beta$ -amyloid (1-40) as the immunogen, an antibody which does not cross react with  $\beta$ -amyloid (1-28) is suitably used as the monoclonal antibody specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid.

9210795

The present inventors established two kinds of hybridomas each of which produces such an antibody. The antibodies produced from these hybridomas did not cross react with  $\beta$ -amyloid (1-28) in competitive enzyme immunoassays using  $\beta$ -galactosidase-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40) described below, but they reacted with  $\beta$ -amyloid (1-40) (antigen concentration giving  $B/B_0=0.5$ : 200 to 250 nM, 40 to 50 ng/well). Furthermore, when they were used in the sandwich methods, particularly in combination with BAN-50a or BAN-052a of monoclonal antibodies prepared using  $\beta$ -amyloid (1-16) described below as the immunogen which recognized the partial peptide on the N-terminal side of the  $\beta$ -amyloid, the result revealed that the  $\beta$ -amyloid could be measured unexpectedly with a higher sensitivity (detection sensitivity: 0.2 pg/well). Namely, as the monoclonal antibodies of one kind specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid suitable for the sandwich enzyme immunoassays of the present invention, monoclonal antibodies which react with  $\beta$ -amyloid (1-40), but do not cross react with  $\beta$ -amyloid (1-28) are suitably used. These antibodies do not necessarily require a high affinity for  $\beta$ -amyloid (1-40). For example, BA-27a is conveniently used as such an antibody.

Further, as the monoclonal antibodies specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid which are used in the sandwich immunoassays of the present invention, antibodies prepared using  $\beta$ -

amyloid (25-35) as the immunogen are suitably used. The present inventors established five kinds of hybridomas producing these antibodies. The antibodies reacted with  $\beta$ -amyloid (25-35) (antigen concentration giving  $B/B_0=0.5$ : 20 nM, 1 ng/well) in competitive enzyme immunoassays using  $\beta$ -galactosidase-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40) described below, and also reacted with  $\beta$ -amyloid (1-40) (antigen concentration giving  $B/B_0=0.5$ : 800 nM, 160 ng/well). Further, the combination of the antibodies with BAN-50a or BAN-052a unexpectedly gives a higher sensitivity (detection sensitivity: 3 pg/well). Namely, in the sandwich enzyme immunoassays of the present invention, monoclonal antibodies to  $\beta$ -amyloid (25-35) are suitably used as the monoclonal antibodies specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid. These antibodies do not necessarily require a high affinity for  $\beta$ -amyloid (1-40). For example, BS-85a is conveniently used as such an antibody.

In the sandwich methods in which BS-85a was combined with BAN-50a or BAN-052a, or BA-27a was combined with BAN-50a or BAN-052a, no cross reactivity with  $\beta$ -amyloid (1-28) was observed.

Furthermore, as the monoclonal antibodies specifically reactive to the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid which are used in the sandwich immunoassays of the present invention, antibodies prepared using  $\beta$ -amyloid (35-43) as the immunogen are suitably used. The

present inventors prepared eighteen kinds of hybridomas producing these antibodies. Of these, four kinds of antibodies exhibited a high reactivity to  $\beta$ -amyloid fractions (formic acid extracts) extracted from the brains of the patients with Alzheimer's disease by the method of Mori et al. [J. Biol. Chem., 267, 17082-17086 (1988)] in competitive enzyme immunoassays using peroxidase-labeled  $\beta$ -amyloid (35-43) described below, whereas they exhibited no reactivity with a synthesized  $\beta$ -amyloid (1-40). The use of these antibodies in the sandwich methods in a combination with BAN-50a showed that the  $\beta$ -amyloids contained in the above-mentioned formic acid extracts from the brains of the patients with Alzheimer's disease were detected with high sensitivity, and that  $\beta$ -amyloid (1-40) was not detected at all. Mass spectrometry indicated that the  $\beta$ -amyloids contained in the formic acid extracts from the brains of the patients with Alzheimer's disease were mainly composed of  $\beta$ -amyloid (1-42), and that they further contained molecular species successively lacking N-terminal portions, including  $\beta$ -amyloid (3-42) having pyroglutamic acid at the N-terminal portion,  $\beta$ -amyloid (2-42) and  $\beta$ -amyloid (4-42).

On the other hand, as the monoclonal antibodies recognizing the partial peptide on the N-terminal side of the  $\beta$ -amyloid which are used in the sandwich immunoassays of the present invention, antibodies prepared using  $\beta$ -amyloid (1-16) as the immunogen are suitably used. The present inventors prepared eight kinds of hybridomas

producing these antibodies. The reactivity of these antibodies to  $\beta$ -amyloid (1-40) was examined by competitive methods using peroxidase-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16) described below. As a result, four kinds of antibodies showed a good

5 reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40) (antigen concentration giving  $B/B_0=0.5$ : 25 to 70 nM, 5 to 15 ng/well). Further, when these antibodies were applied to the sandwich methods, a large difference in sensitivity among these antibodies was unexpectedly observed. Namely, monoclonal antibody

10 BAN-052a gave outstanding high sensitive sandwich determining methods, compared with other three kinds of antibodies (BAN-11a, BAN-20a and BAN-30a). Then, sixteen kinds of antibodies were newly prepared in order to select

15 anti- $\beta$ -amyloid (1-16) monoclonal antibodies more suitable for the sandwich methods, and examined by the competitive methods using peroxidase-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16). As a result, of these antibodies, ten kinds of antibodies showed a good reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40). In particular, BAN-

20 50a gave extremely high sensitive sandwich determining methods among others. Namely, in the present invention, several kinds of antibodies to  $\beta$ -amyloid (1-16) are provided as the antibodies suitable for the sandwich

25 methods, which recognize the partial peptide on the N-terminal side of the  $\beta$ -amyloid, and particularly, BAN-50a and BAN-052a are suitably used.

Further, as the monoclonal antibodies recognizing the partial peptide in the central portion of the  $\beta$ -amyloid

which are used in the sandwich immunoassays of the present invention, antibodies prepared using  $\beta$ -amyloid (18-28) represented by SEQ ID NO: 12 as the immunogen are suitably used. The present inventors prepared nine kinds of

5 hybridomas producing these antibodies. In particular, monoclonal antibodies BP-01a, BP-02a, BP-03a and BP-90a produced from four hybridomas BP-01, BP-02, BP-03 and BP-90 are suitable, and BP-03a and BP-90a can also recognize  $\beta$ -amyloid (17-28) represented by SEQ ID NO: 11. Of these

10 monoclonal antibodies, BP-90a is particularly suitable.

The monoclonal antibodies of the present invention can also be used in assay systems other than the sandwich methods, for example, competitive methods, immunometric methods and nephelometry. In the competitive methods,

15 antigens in test solutions and labeled antigens are competitively reacted with the antibodies, followed by separation of the unreacted labeled antigens (F) from the labeled antigens (B) bound to the antibodies (B/F separation). Then, the labeled amount of either B or F is

20 measured to determine the amount of the antigens in the test solutions. These reaction methods include liquid phase methods in which soluble antibodies are used as the antibodies, and polyethylene glycol and the second antibodies to the above-mentioned antibodies are used for

25 B/F separation, and solidifying methods in which solidified antibodies are used as the first antibodies, or soluble antibodies are used as the first antibodies and solidified

antibodies are used as the second antibodies.

In the immunometric methods, antigens in test solutions and solidified antigens are competitively reacted with fixed amounts of labeled antibodies, followed by  
 5 separation of solid phases from liquid phases, or antigens in test solutions are reacted with excess labeled antibodies, and then, solidified antigens are added to allow the unreacted labeled antibodies to bind to solid phases, followed by separation of the solid phases from  
 10 liquid phases. Then, the labeled amount of either phases is measured to determine the amount of the antigens in the test solutions.

In the nephelometry, the amount of insoluble precipitates produced as a result of antigen-antibody  
 15 reaction in gels or solutions is measured. Even when the amount of antigens in test solutions is slight, and the precipitates are obtained only in small amounts, laser nephelometry utilizing laser scattering is suitably used.

When these immunological assays are applied to the  
 20 present invention, particular conditions and operations are not required to be established. Usual technical consideration of those skilled in the art may be added to ordinary conditions and operations in the respective assays to construct assay systems of the  $\beta$ -amyloids. Details of  
 25 these general technical means can be referred to reviews and books [for example, Radioimmunoassays edited by H. Irie (published by Kodansha in 1974), Radioimmunoassays, second

series, edited by H. Irie (published by Kodansha in 1979),  
KOSO MENEKI SOKUTEIHO(Enzyme Immunoassays), edited by E.  
 Ishikawa et al. (published by Igaku Shoin in 1978), KOSO  
MENEKI SOKUTEIHO(Enzyme Immunoassays) (second edition),  
 5 edited by E. Ishikawa et al. (published by Igaku Shoin in  
 1982), KOSO MENEKI SOKUTEIHO(Enzyme Immunoassays) (third  
edition), edited by E. Ishikawa et al. (published by Igaku  
 Shoin in 1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70  
 (Immunochemical Techniques (Part A) published by Academic  
 10 Press, ibid., Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B),  
ibid., Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C), ibid.,  
 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected  
 Immunoassays), ibid., Vol. 92 (Immunochemical Techniques  
 (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay  
 15 Methods), and ibid., Vol. 121 (Immunochemical Techniques  
 (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)].  
 Accordingly, when the assay systems of the  $\beta$ -amyloids are  
 constructed by the sandwich immunoassays of the present  
 invention, they are not limited to examples described  
 20 below.

As described above, the antibodies of the present  
 invention can determine the  $\beta$ -amyloids or the derivatives  
 thereof with a high sensitivity, so that they are useful as  
 diagnosing agents for Alzheimer's disease.

25

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a graph showing the results of assay of the



antibody titer of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (1-40),  
said antibody titer being assayed by  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -  
amyloid (1-40);

Fig. 2 is a graph showing the results of assay of the  
5 antibody titer of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (25-35),  
said antibody titer being assayed by  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -  
amyloid (1-40);

Fig. 3 is a graph showing the results of assay of the  
antibody titer of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (1-16),  
10 said antibody titer being assayed by HRP-labeled  $\beta$ -amyloid  
(1-16);

Fig. 4 is a graph showing the results of assay of the  
antibody titer of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (35-43),  
said antibody titer being assayed by HRP-labeled  $\beta$ -amyloid  
15 (35-43);

Fig. 5 shows typical examples of screening of  
hybridomas after cell fusion. (a) is a case in which mice  
immunized with  $\beta$ -amyloid (1-40) were used, (b) is a case in  
which mice immunized with  $\beta$ -amyloid (25-35) were used, (c)  
20 is a case in which mice immunized with  $\beta$ -amyloid (1-16)  
were used, and (d) is a case in which mice immunized with  
 $\beta$ -amyloid (35-43) were used;

Fig. 6(a) is a graph showing the results of assay of  
the reactivity of monoclonal antibody BA-27a prepared using  
25  $\beta$ -amyloid (1-40) as an immunogen to  $\beta$ -amyloid (1-40) (-●-),  
 $\beta$ -amyloid (1-28) (-▲-),  $\beta$ -amyloid (1-16) (-O-),  $\beta$ -amyloid  
(25-35) (-□-) and  $\beta$ -amyloid (35-43) (-▲-), said reactivity

being assayed by a competitive method-EIA using  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40), and Fig. 6(b) is a graph similarly showing the results of assay of the reactivity of monoclonal antibody BS-85a prepared using  $\beta$ -amyloid (25-35) as an immunogen, said reactivity being assayed by a competitive method-EIA using  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40);

Figs. 7(a) and 7(b) are graphs each showing the results of assay of the reactivity of monoclonal antibodies BAN-052a and BAN-50a prepared using  $\beta$ -amyloid (1-16) as an immunogen to  $\beta$ -amyloid (1-40) ( $-\square-$ ),  $\beta$ -amyloid (1-28) ( $-\Delta-$ ) and  $\beta$ -amyloid (1-16) ( $-O-$ ), said reactivity being assayed by a competitive method-EIA using HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16);

Fig. 8 is a graph showing the results of assay of the reactivity of BAN-052a ( $-\bullet-$ ), BAN-11a ( $-O-$ ), BAN-20a ( $-\Delta-$ ), BAN-30a ( $-\square-$ ) and BAN-50a ( $-\blacksquare-$ ) to  $\beta$ -amyloid (1-40), said reactivity being examined by a competitive method-EIA using HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16);

Fig. 9 is a graph showing standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-40) in a sandwich EIA using BS-85a-HRP as an enzyme-labeled antibody, and BAN-052a ( $-\bullet-$ ), BAN-11a ( $-\nabla-$ ), BAN-20a ( $-\Delta-$ ) or BAN-30a ( $-\blacksquare-$ ) as antibodies for solid phases;

Fig. 10 is a graph showing standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-40) in a sandwich EIA using BA-27a-HRP as an enzyme-labeled antibody, and BAN-052a ( $-\bullet-$ ), BAN-11a ( $-\nabla-$ ), BAN-20a ( $-\Delta-$ ) or BAN-30a ( $-\blacksquare-$ ) as antibodies for solid

phases;

Fig. 11 is a graph showing standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-40) in a sandwich EIA using BAN-052a-HRP as an enzyme-labeled antibody, and BA-27a (-●-) or BS-85a (-O-) as antibodies for solid phases;

Fig. 12 is a graph showing standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-40) in a sandwich EIA using BAN-052a-HRP (-O-) or BA-27a-HRP (-□-) as enzyme-labeled antibodies, and BAN-052a as an antibody for solid phases;

Fig. 13 is a graph showing standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-40) (-●, ▲-) or  $\beta$ -amyloid (1-28) (-O, △-) in a sandwich EIA using BS-85a-HRP as an enzyme-labeled antibody, and BAN-052a (-●, O-) or BAN-50a (-▲, △-) as antibodies for solid phases;

Fig. 14 is a graph showing standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-40) (-●, ▲-) or  $\beta$ -amyloid (1-28) (-O, △-) in a sandwich EIA using BA-27a-HRP as an enzyme-labeled antibody, and BAN-052a (-●, O-) or BAN-50a (-▲, △-) as antibodies for solid phases;

Fig. 15 shows standard curves of  $\beta$ -amyloid (1-38) (-O-),  $\beta$ -amyloid (1-39) (-△-),  $\beta$ -amyloid (1-40) (-■-),  $\beta$ -amyloid (1-42) (-●-) or  $\beta$ -amyloid (1-28) (-□-) in a sandwich EIA using (a) BS-85a-HRP, (b) BA-27a-HRP or (c) BC-05a-HRP as enzyme-labeled antibodies, and BAN-50a as an antibody for solid phases;

Fig. 16 shows the results of assay of the immunological activity of  $\beta$ -amyloids fractions eluted from

the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by reverse-phase HPLC, said immunological activity being assayed by a sandwich EIA using (a) BS-85a-HRP and (b) BA-27a-HRP as enzyme-labeled antibodies, and BAN-50a as an antibody for solid phases;

Fig. 17 shows the results of fractionation of Alzheimer's disease patient-derived  $\beta$ -amyloid fractions (formic acid extracts) by reverse-phase HPLC (detection wavelength: 210 nm) after partial purification by gel filtration;

Fig. 18 shows mass spectra of (a) No. 35, (b) No. 41 and (c) No. 43 of the eluted fractions by reverse-phase HPLC in Fig. 17 of Alzheimer's disease patient's brain-derived  $\beta$ -amyloid fractions (formic acid extracts); and

Fig. 19 shows the results of determination of the eluted fractions by reverse-phase HPLC in Fig. 17 of Alzheimer's disease patient's brain-derived  $\beta$ -amyloid fractions (formic acid extracts), said determination being conducted by a sandwich EIA using (a) BS-85a-HRP, (b) BA-27a-HRP and (c) BC-05a-HRP as enzyme-labeled antibodies, and BAN-50a as an antibody for solid phases.

## Best Mode for Carrying Out the Invention

### Examples

#### [Example 1] Preparation of Antigens

##### (1) Production of $\beta$ -Amyloid (1-40)

$\beta$ -Amyloid (1-40) was synthesized by using 0.71 g (0.5

mmol) of a commercially available Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM resin (Applied Biosystems) with a peptide synthesizer (Model 430A, Applied Biosystems). The Boc group on the resin was treated with 50% trifluoroacetic acid/methylene chloride to deprotect the amino group. Then, 2 mmol portions of Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Met, Boc-Leu, Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Asn, Boc-Asp(OcHex), Boc-Glu(OcHex), Boc-Phe, Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Ser(Bzl) and Boc-Arg(Tos) were activated with HOBt/DCC and condensed according to the amino acid sequence of  $\beta$ -amyloid (1-40) to obtain 2.70 g of a protected  $\beta$ -amyloid (1-40)-OCH<sub>2</sub>-PAM resin. The resulting protected  $\beta$ -amyloid (1-40)-OCH<sub>2</sub>-PAM resin (0.56 g) was treated with 10 ml of anhydrous hydrogen fluoride in the presence of p-cresol at 0°C for 60 minutes, followed by removal of excess hydrogen fluoride by distillation under reduced pressure. The residue was washed twice with 10 ml of ether, and then extracted with 50% aqueous acetic acid. The insoluble material was removed by filtration, followed by washing with 50% aqueous acetic acid. The filtrate and the washings were combined, and the combined solution was concentrated to 2 to 3 ml under reduced pressure. The concentrated solution was subjected to a Sephadex G-25 column (2.0 X 85 cm) charged with 50% aqueous acetic acid, and developed with the same solvent. The main fractions were collected and lyophilized to obtain about 150 mg of a yellowish white powder. This was dissolved in 50 ml of 20% aqueous acetonitrile

4210795  
- 57 -

(containing 0.1% trifluoroacetic acid), and the resulting solution was subjected to a LiChroprep RP-18 column (4.1 X 10 cm) filled with the same solvent to elute the column with a linear gradient of from 20% to 70% aqueous

5 acetonitrile (containing 0.1% trifluoroacetic acid). The main fractions were collected and subjected to a LiChroprep RP-18 column (2.6 X 6 cm) again to elute the column with a linear gradient of from 0% to 50% aqueous acetonitrile (containing 0.1% trifluoroacetic acid). The main fractions  
10 were collected and lyophilized to obtain 10 mg of a white powder.

Anal. for amino acids:

Gly 6.85(6), Ala 3.44(3), Val 5.68(6), Leu 2.00(2),  
Ile 1.39(2), Met 0.89(1), Phe 3.21(3), Ser 1.89(2),  
15 Asp 4.35(4), Glu 4.52(4), Lys 2.05(2), His 2.86(3),  
Arg 1.10(1), Tyr 0.97(1)

(M + H)+ by mass spectrometry: 4328.05

HPLC elution time: 22.8 minutes

Column conditions

20 Column: Wakosil-5C18 HG (4.6 X 100 mm)

Eluents: A (0.1% aqueous trifluoroacetic acid)

B (acetonitrile containing 0.1%  
trifluoroacetic acid)

A linear gradient elution from eluent A to eluent B  
25 (for 50 minutes)

Flow rate: 1.0 ml/minute

(2) Production of [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -Amyloid (1-16)

[Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -Amyloid (1-16) was synthesized by using 0.75 g (0.5 mmol) of a commercially available Boc-Cys(MeBzl)-OCH<sub>2</sub>-PAM resin (Applied Biosystems) with a peptide synthesizer (Model 430A, Applied Biosystems). The Boc group on the resin was treated with 50% trifluoroacetic acid/methylene chloride to deprotect the amino group. Then, 2 mmol portions of Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Val, Boc-Glu(OcHex), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asp(OcHex), Boc-Arg(Tos) and Boc-Phe were activated with HOBt/DCC and condensed according to the amino acid sequence of [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -Amyloid (1-16) to obtain 1.90 g of a protected [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -Amyloid (1-16) (MeBzl)-OCH<sub>2</sub>-PAM resin. The resulting protected [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -Amyloid (1-16) (MeBzl)-OCH<sub>2</sub>-PAM resin (0.68 g) was treated with 10 ml of anhydrous hydrogen fluoride in the presence of p-cresol at 0°C for 60 minutes, followed by removal of excess hydrogen fluoride by distillation under reduced pressure. The residue was washed twice with 10 ml of ether, and then extracted with 50% aqueous acetic acid. The insoluble material was removed by filtration, followed by washing with 50% aqueous acetic acid. The filtrate and the washings were combined, and the combined solution was concentrated to 1 to 2 ml under reduced pressure. The concentrated solution was subjected to a Sephadex G-25 column (2.0 X 85 cm) filled with 50% aqueous acetic acid, and developed with the same solvent. The main fractions were collected and lyophilized to obtain 136.7 mg of a

02107.95  
- 59 -

white powder.

Anal. for amino acids:

Asp 2.17(2), Ser 0.96(1), Glu 3.04(3), Gly 1.00(1),  
Ala 1.00(1), Cys 0.82(1), Val 0.99(1), Tyr 0.94(1),  
5 Phe 1.09(1), Lys 1.05(1), His 2.89(3), Arg 0.97(1),  
(M + H)<sup>+</sup> by mass spectrometry: 2056.83

HPLC elution time: 14.8 minutes

Column conditions

Column: Wakosil-5C18 HG (4.6 X 100 mm)  
10 Eluents: A (0.1% aqueous trifluoroacetic acid)  
B (acetonitrile containing 0.1%  
trifluoroacetic acid)  
A linear gradient elution from eluent A to eluent B  
(for 50 minutes)

15 Flow rate: 1.0 ml/minute

(3) Production of  $\beta$ -Amyloid (25-35)

$\beta$ -Amyloid (25-35) was synthesized by using 0.66 g (0.5  
mmol) of a commercially available Boc-Met-OCH<sub>2</sub>-PAM resin  
(Applied Biosystems) with a peptide synthesizer (Model  
20 430A, Applied Biosystems). The Boc group on the resin was  
treated with 50% trifluoroacetic acid/methylene chloride to  
deprotect the amino group. Then, 2 mmol portions of Boc-  
Leu, Boc-Gly, Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Asn and  
Boc-Ser(Bzl) were activated with HOBt/DCC and condensed  
25 according to the amino acid sequence of  $\beta$ -amyloid (25-35)  
to obtain 1.14 g of a protected  $\beta$ -amyloid (25-35)-OCH<sub>2</sub>-PAM  
resin. The resulting protected  $\beta$ -amyloid (25-35)-OCH<sub>2</sub>-PAM



11210795  
- 60 -

resin (0.61 g) was treated with 10 ml of anhydrous hydrogen fluoride in the presence of p-cresol at 0°C for 60 minutes, followed by removal of excess hydrogen fluoride by distillation under reduced pressure. The residue was  
5 washed twice with 10 ml of ether, and then extracted with 50% aqueous acetic acid. The insoluble material was removed by filtration, followed by washing with 50% aqueous acetic acid. The filtrate and the washings were combined, and the combined solution was concentrated to 2 to 3 ml  
10 under reduced pressure. The concentrated solution was diluted with 50 ml of 0.1% aqueous trifluoroacetic acid, and then subjected to a LiChroprep RP-18 column (2.6 X 10 cm) filled with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid to elute the column with a linear gradient of from 0% to 50% aqueous  
15 acetonitrile (containing 0.1% trifluoroacetic acid). The main fractions were collected and lyophilized to obtain 100 mg of a white powder. This powder was dissolved in 0.5 ml of N-acetic acid, and subjected to a Sephadex LH-20 column (1.0 X 96 cm) filled with the same solvent. The main  
20 fractions were collected and lyophilized to obtain 91 mg of a white powder.

Anal. for amino acids:

Asp 0.97(1), Ser 0.95(1), Gly 2.94(3), Ala 1.00(1),  
Met 0.89(1), Ile 1.59(2), Leu 1.00(1), Lys 0.97(1),

25 (M + H)+ by mass spectrometry: 2056.83

HPLC elution time: 18.9 minutes

Column conditions

Column: Wakosil-5C18 HG (4.6 X 100 mm)

Eluents: A (0.1% aqueous trifluoroacetic acid)

B (acetonitrile containing 0.1%

trifluoroacetic acid)

5 A linear gradient elution from eluent A to eluent B  
(for 50 minutes)

Flow rate: 1.0 ml/minute

(4) Production of [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -Amyloid (35-43)

A Fmoc-Thr(tBu)-Wang resin (0.46 g: 0.25 mmol,  
10 Watanabe Kagaku) was used as a starting material. After  
deprotection of the Fmoc group with a 20% piperidine-DMF  
solution, the peptide chain was sequentially extended from  
the C-terminal side by the DCC-HOBt method, using a Fmoc-  
amino acid derivative cartridge (1.0 mmol, Applied  
15 Biosystems). Thus, 0.73 g of a protected peptide resin  
represented by the following formula was obtained:

Fmoc-Cys(Trt)-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-  
Thr(tBu)-Wang resin

Then, 0.75 g of phenol, 0.25 ml of butanedithiol, 0.5  
20 ml of thioanisole, 0.5 ml of deionized water and 10 ml of  
trifluoroacetic acid were added to 0.58 g (0.20 mmol) of  
this peptide resin under ice cooling, and the mixture was  
stirred at room temperature for 1.5 hours. The resin was  
removed by filtration, and the filtrate was concentrated.  
25 Ether was added to the residue under ice cooling, and a  
precipitate was collected by filtration. After thorough  
washing with ether, the precipitate was dried to obtain a

11210795  
- 62 -

white powder.

Yield: 168 mg (89%)

(M + H)<sup>+</sup> by mass spectrometry: 949.5 (theoretical  
value = 949.5)

5 (5) Preparation of  $\beta$ -Amyloid (1-38) and  $\beta$ -Amyloid (1-39)

$\beta$ -Amyloid (1-40) was restrictedly hydrolyzed with  
carboxypeptidase Y, thereby preparing  $\beta$ -amyloid (1-38) and  
 $\beta$ -amyloid (1-39). Namely, 50  $\mu$ g of  $\beta$ -amyloid (1-40)  
(Bachem) and 0.5  $\mu$ g of carboxypeptidase Y (Oriental Yeast  
10 Co., Ltd.) were dissolved in 0.5% aqueous ammonium acetate  
to bring it up to 60  $\mu$ l, followed by reaction at 10°C for 2  
hours. After reaction, the product was fractionated by  
reverse-phase HPLC using a Vydac C4 column (The  
Sep/a/ra/tions Group), and three main peaks detected by UV  
15 (210 nm) were identified by mass spectrometry.

Column conditions

Column: Vydac C4 (The Sep/a/ra/tions Group, 4.6 X 250  
mm)

Eluents: A (5% acetonitrile containing 0.1%  
20 trifluoroacetic acid)  
B (80% acetonitrile containing 0.1%  
trifluoroacetic acid)

Elution Method: The concentration of eluent B was  
first maintained to 30% for 5 minutes,  
25 and then linearly increased to 30-50%  
for 60 minutes.

Flow rate: 0.5 ml/minute

(M + H)+ by mass spectrometry: 4132.9:  $\beta$ -amyloid (1-38)  
(theoretical value = 4132.6)  
4231.6:  $\beta$ -amyloid (1-39)  
(theoretical value = 4231.8)  
5 4330.9:  $\beta$ -amyloid (1-40)  
(theoretical value = 4330.9)

[Example 2] Preparation of Immunogens

(1) Preparation of Immunogen Comprising  $\beta$ -Amyloid (1-40)

A complex of  $\beta$ -amyloid (1-40) obtained in Example 1  
10 (1) described above and bovine thyroglobulin (BTG) was  
prepared, and used as an immunogen. Namely, 0.6 mg of  $\beta$ -  
amyloid (1-40) was dissolved in 1.1 ml of 3 mM phosphate  
buffer (pH 6.5) containing 15% DMF, and then 2.5 mg of BTG  
dissolved in 0.5 ml of water was added thereto. Further,  
15 glutaraldehyde was added to give a final concentration of  
0.3%, followed by reaction at room temperature for 3 hours.  
After reaction, the product was dialyzed against  
physiological saline at 4°C for 2 days.

(2) Preparation of Immunogen Containing  $\beta$ -Amyloid (25-35)

20 A complex of  $\beta$ -amyloid (25-35) obtained in Example 1  
(3) described above and BTG was prepared, and used as an  
immunogen. Namely, 0.5 mg of  $\beta$ -amyloid (25-35) and 2.5 mg  
of BTG were dissolved in 1 ml of water adjusted to pH 4.5,  
and glutaraldehyde was further added to give a final  
25 concentration of 0.4%, followed by reaction at room  
temperature for 3 hours. After reaction, the product was  
dialyzed against physiological saline at 4°C for 2 days.

(3) Preparation of Immunogen Containing  $\beta$ -Amyloid (1-16)

A complex of [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -amyloid (1-16) obtained in Example 1 (2) and BTG was prepared, and used as an immunogen. Namely, 20 mg of BTG was dissolved in 1.4 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9), and the resulting solution was mixed with 100  $\mu$ l of a DMF solution containing 2.2 mg (8  $\mu$ moles) of N-( $\gamma$ -maleimidobutyryloxy)succinimide (GMBS), followed by reaction at room temperature for 40 minutes. After reaction, the product was fractionated on a Sephadex G-25 column. Then, 15 mg of maleimide group-introduced BTG was mixed with 3.6 mg of [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -amyloid (1-16), followed by reaction at 4°C for 2 days. After reaction, the product was dialyzed against physiological saline at 4°C for 2 days.

(4) Preparation of Immunogen Containing  $\beta$ -Amyloid (35-43)

A complex of [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -amyloid (35-43) obtained in Example 1 (4) and bovine serum albumin (BSA) was prepared, and used as an immunogen. Namely, 21 mg (0.31  $\mu$ mol) of BSA was dissolved in 1.4 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8), and the resulting solution was mixed with 100  $\mu$ l of a DMF solution containing 3.5 mg (12.5  $\mu$ moles) of GMBS, followed by reaction at room temperature for 35 minutes. After reaction, the product was fractionated on a Sephadex G-25 column. Then, 4.5 mg of maleimide group-introduced BSA was mixed with 2.1 mg of [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -amyloid (35-43), followed by reaction overnight at 4°C. After reaction, the product was dialyzed against physiological saline at 4°C for 2 days.

(5) Preparation of Immunogen Containing  $\beta$ -Amyloid (18-28)

A complex of [Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -amyloid (18-28) and BTG was prepared, and used as an immunogen. Namely, 21 mg of -BTG was dissolved in 1.5 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9),  
 5 and the resulting solution was mixed with 100  $\mu$ l of a DMF solution containing 2.4 mg (8.4  $\mu$ moles) of GMBS, followed by reaction at room temperature for 40 minutes. After reaction, the product was fractionated on a Sephadex G-25 column. Then, about 7 mg of maleimide group-introduced BTG  
 10 was mixed with 2.0 mg of [Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -amyloid (18-28) (Accord), followed by reaction overnight at 4°C. After reaction, the product was dialyzed against physiological saline at 4°C for 3 days.

[Example 3] Immunization

15 Six to eight-week-old BALB/C female mice were subcutaneously immunized with about 80  $\mu$ g/mouse of each of the immunogens obtained in Example 2 described above, the  $\beta$ -amyloid (1-40)-BTG complex, the  $\beta$ -amyloid (25-35)-BTG complex, the  $\beta$ -amyloid (1-16)-BTG complex, the  $\beta$ -amyloid  
 20 (35-43)-BSA complex and the  $\beta$ -amyloid (18-28)-BTG complex, together with Freund's complete adjuvant. Thereafter, the mice were supplementally immunized with the same dose of each of the immunogens, together with Freund's incomplete adjuvant, 2 to 3 times at 3 week intervals.

25 [Example 4] Preparation of Enzyme-Labeled Antigens

(1) Preparation of  $\beta$ -D-Galactosidase ( $\beta$ -Gal)-Labeled  $\beta$ -Amyloid (1-40)

In 40  $\mu$ l of DMSO was dissolved 70  $\mu$ g (16 nmols) of  $\beta$ -amyloid (1-40), and 160 nmols (10  $\mu$ l DMSO solution) of triethylamine and 23 nmols (7  $\mu$ l DMSO solution) of N-succinimidyl-3-(2-pyrimidyldithio)propionate (SPDP) were  
 5 added thereto, followed by reaction at room temperature for 90 minutes. The total amount of the reaction solution was added to 1.7 mg (3.3 nmols) of  $\beta$ -Gal (for enzyme immunoassay, Boehringer Mannheim) dissolved in 0.45 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), followed by reaction at  
 10 4°C for a day. After reaction, the product was fractionated on an Ultrogel ACA34 column (LKB-Pharmacia) to obtain  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40).

(2) Preparation of Horseradish Peroxidase (HRP)-Labeled  $\beta$ -Amyloid (1-16)

15 [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -amyloid (1-16) obtained in Example 1 (2) described above was crosslinked with HRP (for enzyme immunoassay, Boehringer Mannheim) to prepare a labeled material for enzyme immunoassay (EIA). Namely, 5 mg (125 nmols) of HRP was dissolved in 0.95 ml of 0.1 M phosphate  
 20 buffer (pH 6.8), and the resulting solution was mixed with 50  $\mu$ l of a DMF solution containing 3.6 mg (1.3  $\mu$ mol) of GMBS, followed by reaction at room temperature for 30 minutes. Thereafter, the reaction product was fractionated on a Sephadex G-25 column. Then, 3.3 mg (78 nmols) of  
 25 maleimide group-introduced HRP was mixed with 0.56 mg (270 nmols) of [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -amyloid (1-16), followed by reaction at 4°C for a day. After reaction, the product was

fractionated on an Ultrogel AcA34 column (LKB-Pharmacia) to obtain HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16).

### (3) Preparation of HRP-Labeled $\beta$ -Amyloid (35-43)

[Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -amyloid (35-43) obtained in Example 1 (4) described above was crosslinked with HRP to prepare a labeled material for EIA. Namely, 12 mg (310 nmols) of HRP was dissolved in 1.4 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8), and the resulting solution was mixed with 100  $\mu$ l of a DMF solution containing 1.3 mg (4.5  $\mu$ mols) of GMBS, followed by reaction at room temperature for 30 minutes. Thereafter, the reaction product was fractionated on a Sephadex G-25 column. Then, 3.2 mg (76 nmols) of maleimide group-introduced HRP thus prepared was mixed with 2.1 mg (7.2  $\mu$ mols) of [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -amyloid (35-43) obtained in Example 1(4), followed by reaction at 4°C for a day. After reaction, the product was fractionated on an Ultrogel AcA34 column to obtain HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (35-43).

### (4) Preparation of HRP-Labeled $\beta$ -Amyloid (18-28)

[Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -amyloid (18-28) was crosslinked with HRP to prepare a labeled material for EIA. Namely, 16 mg (390 nmols) of HRP was dissolved in 1.4 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8), and the resulting solution was mixed with 100  $\mu$ l of a DMF solution containing 1.1 mg (3.9  $\mu$ mols) of GMBS, followed by reaction at room temperature for 40 minutes. Thereafter, the reaction product was fractionated on a Sephadex G-25 column. Then, 6.0 mg (150 nmols) of maleimide group-introduced HRP thus prepared was mixed with



01210795

2.5 mg (1.9  $\mu$ moles) of [Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -amyloid (18-28), followed by reaction at 4°C for 2 days. After reaction, the product was fractionated on an Ultrogel AcA34 column to obtain HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (18-28).

5 [Example 5] Determination of Antibody Titer

(1) Determination of Antibody Titer in Antisera of Mice Immunized with  $\beta$ -Amyloid (1-40)

The antibody titer in the antisera of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (1-40) was determined by the following  
10 method. In order to prepare an anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate, 100  $\mu$ l of 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) containing 100  $\mu$ g/ml of an anti-mouse immunoglobulin antibody (IgG fraction, Kappel) was poured into each well of a 96-well microplate, and allowed to  
15 stand at 4°C for 24 hours. Then, the plate was washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), and thereafter 300  $\mu$ l of PBS containing 25% Block Ace (Snow Brand Milk Products) was poured into each well to block excess binding sites of the wells, followed by treatment at 4°C for at  
20 least 24 hours. To each well of the above-mentioned anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate were added 50  $\mu$ l of buffer A [0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1% BSA, 0.1 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% CHAPS [3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid  
25 and 0.1% NaN<sub>3</sub>] and 100  $\mu$ l of the mouse anti- $\beta$ -amyloid (25-35) antiserum diluted with buffer A, followed by reaction at 4°C for 16 hours. Then, after the plate was washed with

PBS, 100  $\mu$ l of  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40) prepared in Example 4 (1) described above (200-fold dilution with buffer A) was added, followed by reaction at room temperature for a day. Then, after the plate was washed with PBS, 100  $\mu$ l of a solution of 20  $\mu$ g/ml 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside (4-MUG) in buffer A (with the proviso that CHAPS was not contained) was added, followed by reaction at 37°C for 3 hours, in order to assay the enzyme activity on the solid phase by 4-MUG. After 100  $\mu$ l of 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  was added to terminate the reaction, released 4-methylumbelliferone was determined at an excitation wavelength of 355 nm at a determination wavelength of 460 nm by the use of a fluorescence plate reader (Fluoroscan II, Labosystem). Results are shown in Fig. 1. Of the 8 immunized mice, 4 mice exhibited a relatively high antibody titer.

(2) Determination of Antibody Titer in Antisera of Mice Immunized with  $\beta$ -Amyloid (25-35)

The antibody titer in the antisera of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (25-35) was determined in a manner similar to that described above. To each well of the anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate were added 50  $\mu$ l of buffer A, 50  $\mu$ l of the mouse anti- $\beta$ -amyloid (25-35) antiserum diluted with buffer A and 50  $\mu$ l of  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40) prepared in Example 4 (1) described above (100-fold dilution with buffer A), followed by reaction at 4°C for 16 hours. Then, after the plate was washed with

PBS, the enzyme activity on the solid phase was similarly determined by the use of 4-MUG. Results are shown in Fig.

2. Of the 8 immunized mice, the 5 mice exhibited a relatively high antibody titer.

5 (3) Determination of Antibody Titer in Antisera of Mice Immunized with  $\beta$ -Amyloid (1-16)

The antibody titer in the antisera of mice immunized with  $\beta$ -amyloid (1-16) was determined by the following method. To each well of the anti-mouse immunoglobulin  
10 antibody-binding microplate were added 50  $\mu$ l of buffer C [0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% BSA, 0.4 M NaCl and 2 mM EDTA], 50  $\mu$ l of the mouse anti- $\beta$ -amyloid (1-16) antiserum diluted with buffer C and 50  $\mu$ l of HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16) prepared in Example 4 (2)  
15 described above (200-fold dilution with buffer C), followed by reaction at 4°C for 16 hours. Then, after the plate was washed with PBS, the enzyme activity on the solid phase was determined by adding 100  $\mu$ l of a TMB microwell peroxidase substrate system (KIRKEGAARD & PERRY LAB, INC., supplied by  
20 Funakosi Yakuhin), and reacting it at room temperature for 10 minutes. After 100 $\mu$ l of 1 M phosphoric acid was added to terminate the reaction, the absorption at 450 nm was measured with a plate reader (MTP-32, Corona). Results are shown in Fig. 3. An increase in antibody titer to  $\beta$ -  
25 amyloid (1-16) was observed in all of the 7 immunized mice.

(4) Determination of Antibody Titer in Antisera of Mice Immunized with  $\beta$ -Amyloid (35-43)

According to the method described in Example 5 (3) described above, the anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate, the mouse anti- $\beta$ -amyloid (35-43) antiserum and the HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (35-43) prepared in Example 4 (3) described above were reacted with one another to determine the antibody titer in the sera of mice. Results are shown in Fig. 4. Of the 9 immunized mice, 3 mice exhibited a relatively high antibody titer.

#### (5) Determination of Antibody Titer in Antisera of Mice

##### 10 Immunized with $\beta$ -Amyloid (18-28)

According to the method described in Example 5 (3) described above, the anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate, the mouse anti- $\beta$ -amyloid (18-28) antiserum and the HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (18-28) prepared in Example 4 (4) described above were reacted with one another to determine the antibody titer in the sera of mice. Of the 7 immunized mice, the 4 mice exhibited a relatively high antibody titer.

#### [Example 6] Preparation of Monoclonal Anti- $\beta$ -Amyloid

##### 20 Antibody

Each of the mice which showed a relatively high antibody titer was intravenously inoculated with 0.25 to 0.3 ml of physiological saline in which 200 to 300  $\mu$ g of the immunogen was contained to perform the final immunization. The spleens were taken out of the mice 3 to 4 days after the final immunization, pressed by a stainless mesh, filtered and floated in Eagle's minimum essential

- 72 -

0210795

medium (MEM) to obtain a spleen cell floating solution. As cells used for cell fusion, BALB/C mouse-derived myeloma cells P3-X63.Ag8.U1 (P3U1) were used [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1 (1978)]. The cell

5 fusion was conducted according to the original method [Nature, 256, 495 (1975)]. Namely, the spleen cells and P3U1 were each washed 3 times with serum-free MEM, and mixed so as to give a spleen cell number to P3U1 number ratio of 5:1. The mixture was centrifuged at 800 rpm for

10 15 minutes to precipitate the cells. After the supernatant was removed, the precipitate was lightly loosened, and 0.3 ml of 45% polyethylene glycol (PEG) 6000 (Kochlight) was added thereto. Then, the mixture was allowed to stand in a water bath at 37°C for 7 minutes to perform fusion. After

15 fusion, MEM was added to the cells at a rate of 2 ml per minute. After the total amount of MEM added reached 15 ml, the supernatant was removed by centrifugation at 600 rpm for 15 minutes. The resulting cell precipitate was floated in GIT medium (Wako Pure Chemical Industries) containing

20 10% fetal calf serum (GIT-10% FCS) so as to give  $2 \times 10^5$  P3U1 cells per ml. The cell suspension was plated in 120 wells of 24-well multi-dishes (Linbro) in an amount of 1 ml per well. After plating, the cells were incubated in a 5% carbon dioxide incubator at 37°C. After 24 hours, GIT-10%

25 FCS medium containing HAT ( $1 \times 10^{-4}$  M hypoxanthine,  $4 \times 10^{-7}$  M aminopterin and  $1.6 \times 10^{-3}$  M thymidine) (HAT medium) was added in an amount of 1 ml per well to initiate HAT

selective culture. The HAT selective culture was continued by discarding 1 ml of old liquor and then adding 1 ml of HAT medium, 3, 6 and 9 days after initiation of the culture. Growth of hybridoma cells was observed 9 to 14 days after cell fusion. When the culture solution was turned yellow (about  $1 \times 10^6$  cells/ml), the supernatant was collected and the antibody titer was determined according to the method described in Example 5.

As a typical example of screening of the mouse-derived hybridomas immunized with  $\beta$ -amyloid (1-40), results obtained using mouse No. 1 (see Fig. 1) are shown in Fig. 5 (a). Including this, two kinds of hybridomas were selected in total (Table 1).

Table 1

Reaction Specificity of Anti- $\beta$ -Amyloid (23-35) and (1-40)  
Monoclonal Antibodies

		Reactivity <sup>1)</sup>				
5	Hybridoma					
	<u>Strain No.</u>	<u>Immunogen</u>	<u><math>\beta</math>A(1-40)</u>	<u><math>\beta</math>A(1-28)</u>	<u><math>\beta</math>A(25-35)</u>	<u>Note</u>
	1	$\beta$ A(1-40)	$\pm$	-	-	BA-27
	2	$\beta$ A(1-40)	$\pm$	-	-	
	3	$\beta$ A(25-35)	$\pm$	-	+	
10	4	$\beta$ A(25-35)	$\pm$	-	+	
	5	$\beta$ A(25-35)	$\pm$	-	+	BS-85
	6	$\beta$ A(25-35)	$\pm$	-	+	
	7	$\beta$ A(25-35)	$\pm$	-	+	

1) When 100 nM of the antigen [ $\beta$ A(1-40),  $\beta$ A(1-28) or  $\beta$ A(25-35)] existed,

+:  $(B/B_0) < 0.50$

±:  $0.50 \leq (B/B_0) < 0.90$

-:  $0.90 \leq (B/B_0)$

wherein B: the amount of  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ A(1-40) bound to  
the antibody when the antigen existed

$B_0$ : the amount of  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ A(1-40) bound to  
the antibody when the antigen did not exist.

As a typical example of screening of the mouse-derived hybridomas immunized with  $\beta$ -amyloid (25-35), results obtained using mouse No. 8 (see Fig. 2) are shown in Fig. 5 (b). Including this, five kinds of hybridomas were  
5 selected in total (Table 1).

As a typical example of screening of hybridomas which are derived from mice immunized with  $\beta$ -amyloid (1-16), results obtained using mouse No. 5 (see Fig. 3) are shown in Fig. 5 (c). Including these, 8 hybridoma strains were  
10 first selected, and thereafter 16 hybridoma strains were further selected (Table 2).

As a typical example of screening of the mouse-derived hybridomas immunized with  $\beta$ -amyloid (35-43), results obtained using mouse No. 4 (see Fig. 4) are shown in Fig. 5  
15 (d). Including these, eighteen kinds of hybridomas were selected in total (Table 3). Further, the mouse-derived hybridomas immunized with  $\beta$ -amyloid (18-28) were screened to select nine kinds of hybridomas in total (Table 4).



0210795  
- 76 -

Table 2

Reactivity of Anti- $\beta$ -Amyloid (1-16) Monoclonal Antibody

		<u>Reactivity<sup>1)</sup></u>			
	<u>Hybridoma No.</u>	<u><math>\beta</math>A(1-40)</u>	<u><math>\beta</math>A(1-28)</u>	<u><math>\beta</math>A(1-16)</u>	<u>Note</u>
5	1	+	+	+	BAN-052
	2	+	+	+	BAN-11
	3	+	+	+	BAN-30
	4	±	-	+	
	5	±	±	+	
10	6	+	+	+	BAN-20
	7	-	-	+	
	8	-	-	+	
	9	+	-	+	BAN-40
	10	+	+	+	
15	11	+	+	+	
	12	+	+	+	BAN-50
	13	+	±	+	
	15	+	+	+	
	16	±	±	+	
20	17	+	+	+	
	18	+	+	+	
	19	+	+	+	
	20	±	-	+	
	21	-	-	+	
25	22	+	+	+	
	23	±	±	+	
	24	±	-	+	

810795  
- 77

1) When 100 nM of the antigen [ $\beta$ A(1-40),  $\beta$ A(1-28) or  $\beta$ A(1-16)] existed,

+ :  $(B/B_0) < 0.50$

± :  $0.50 \leq (B/B_0) < 0.80$

5        - :  $0.80 \leq (B/B_0)$

wherein B: the amount of HRP-labeled  $\beta$ A(1-16) bound to  
the antibody when the antigen existed

$B_0$ : the amount of HRP-labeled  $\beta$ A(1-16) bound to  
the antibody when the antigen did not exist.

Table 3

<u>Reactivity of Anti-<math>\beta</math>-Amyloid (35-43) Monoclonal Antibody</u>					
<u>Reactivity<sup>1)</sup></u>					
	Hybridoma		Brain	Class/	
5	<u>Strain No.</u>	<u><math>\beta</math>A(35-43)</u>	<u>Fraction</u>	<u>Subclass</u>	<u>Note</u>
	1	+	-		
	2	$\pm$	-		
	3	+	-	IgA, $\kappa$	BC-25
	4	+	-	IgG3, $\kappa$	BC-35
10	5	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-05
	6	+	-		
	7	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-15
	8	+	$\pm$	IgG3, $\kappa$	BC-65
	9	+	-		
15	10	+	$\pm$		
	11	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-75
	12	+	$\pm$		
	13	+	-	IgM, $\kappa$	BC-95
	14	+	$\pm$		
20	15	+	+	IgG1, $\kappa$	BC-55
	16	+	$\pm$		
	17	+	-		
	18	+	-		

1) When 500 ng/ml of  $\beta$ A(35-43) or 100  $\mu$ g/ml of the brain  
 25 extract of patients with Alzheimer's disease existed,

+:  $(B/B_0) < 0.6$

$\pm$ :  $0.6 \leq (B/B_0) < 0.8$

4210795  
- 79 -

$$-: 0.8 \leq (B/B_0)$$

wherein B: the amount of HRP-labeled  $\beta A(35-43)$  bound to  
the antibody when the antigen existed

5  $B_0$ : the amount of HRP-labeled  $\beta A(35-43)$  bound to  
the antibody when the antigen did not exist.

0210795  
- 80 -

Table 4

Reactivity of Anti- $\beta$ -Amyloid (18-28) Monoclonal Antibody

Reactivity <sup>1)</sup>				-
Hybridoma				
<u>Strain No.</u>	<u>βA(17-28)</u>	<u>βA(18-28)</u>	<u>βA(1-28)</u>	<u>Note</u>
1	+	+	-	
2	-	+	-	BP-01
3	-	+	-	BP-02
4	+	+	-	BP-03
5	±	+	-	
6	+	+	-	BP-90
7	-	+	-	
8	-	+	-	
9	±	+	-	

15 1) When 500 ng/ml of  $\beta$ A(17-28) or  $\beta$ A(18-28), or 1  $\mu$ g of  $\beta$ A(1-28) existed,

+:  $(B/B_0) < 0.6$

$\pm$ :  $0.6 \leq (B/B_0) < 0.8$

-:  $0.8 \leq (B/B_0)$

20 wherein B: the amount of HRP-labeled  $\beta$ A(18-28) bound to the antibody when the antigen existed

$B_0$ : the amount of HRP-labeled  $\beta$ A(18-28) bound to the antibody when the antigen did not exist.

Then, these hybridomas were cloned by the limiting dilution method. In cloning, the BALB/C mouse thymocytes were added as feeder cells at  $5 \times 10^5$  cells per well. After cloning, each of the hybridomas was intraperitoneally given at 1 to  $3 \times 10^6$  cells/mouse to mice (BALB/C) each of which had previously been given 0.5 ml of mineral oil intraperitoneally. After 6 to 20 days, the antibody-containing ascites was collected.

Each of the monoclonal antibodies was purified from the resulting ascites with a Protein-A column. That is, 6 to 20 ml of the ascites was diluted with the same amount of binding buffer (1.5 M glycine containing 3.5 M NaCl and 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 9.0), and then subjected to a recombinant protein-A-agarose (Repligen) column previously equilibrated with the binding buffer to elute the specific antibody with elution buffer (0.1 M citrate buffer containing 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 3.0). The eluate was dialyzed against PBS at  $4^\circ\text{C}$  for 2 days, followed by sterile filtration with a 0.22- $\mu\text{m}$  filter (Millipore). The purified solution was stored at  $4^\circ\text{C}$  or  $-80^\circ\text{C}$ . The class and subclass of the monoclonal antibodies were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a purified monoclonal antibody-binding solid phase. Namely, 100  $\mu\text{l}$  of 0.1 M carbonate buffer containing 2  $\mu\text{g/ml}$  of the antibody (pH 9.6) was poured into each well of a 96-well microplate, followed by standing at  $4^\circ\text{C}$  for 24 hours. The excess binding sites of the wells were blocked with Block Ace according to the method described in Example

4210795

- 82 -

5 described above, followed by examination of the class and subclass of the solidified antibody by ELISA using an isotype typing kit (Mouse-Typer<sup>TM</sup> Sub-Isotyping Kit, BioRAD).

5 [Example 7] Competitive Method-Enzyme Immunoassays

(1) Competitive Method-EIA (1)

The reaction specificity of the monoclonal antibody prepared using  $\beta$ -amyloid (1-40) or  $\beta$ -amyloid (25-35) as the immunogen was examined by the following method. First, the  
10 antibody titer of each monoclonal antibody solution was examined according to the method described in Example 5 (1) or Example 5 (2), and the antibody concentration (about 3 to 15 ng/ml) in which the amount of the labeled material bound reached about 40% of the saturated amount bound was  
15 determined as the antibody concentration used in the competitive method-EIA. Then, 50  $\mu$ l of an antibody solution diluted with buffer A to the determined concentration, 50  $\mu$ l of a buffer A solution of the  $\beta$ -amyloids or the partial peptides thereof, namely  $\beta$ -amyloid  
20 (1-40) ( $\beta$ -amyloid (1-40) purchased from Bachem was hereinafter used for immunoassay),  $\beta$ -amyloid (1-28) (purchased from Peninsula) and  $\beta$ -amyloid (25-35), and 50  $\mu$ l of  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40) described in Example 4 (1) mentioned above (100-fold dilution with buffer A) were  
25 added to each well of the anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate described in Example 5 mentioned above, followed by reaction at 4°C for 16 hours.

4210795

- 83 -

After reaction, the plate was washed with PBS, and then the enzyme activity on the solid phase was assayed by the method described in Example 5 (2) mentioned above. Results are shown in Table 1. All the antibodies reacted with  $\beta$ -Gal-labeled  $\beta$ -amyloid (1-40), and also had reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40) (Table 1).

As typical examples, the results of the competitive method-EIA in which BA-27a (IgG2a,  $\kappa$ ) or BS-85a (IgG1,  $\kappa$ ) was used as an antibody to  $\beta$ -amyloid (1-40) or  $\beta$ -amyloid (25-35), respectively, are shown in Fig. 6. The standard curve of BA-27a to  $\beta$ -amyloid (1-40) revealed that the concentration of  $\beta$ -amyloid (1-40) giving  $(B/B_0)=0.5$  was 200 nM, 40 ng/well. Further, this antibody did not exhibit cross reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-16),  $\beta$ -amyloid (1-28) and  $\beta$ -amyloid (25-35). This proved that the antibody reacted with the partial peptide on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid, but did not recognize the partial structure of  $\beta$ -amyloid (25-35) (Fig. 6 (a)). On the other hand, the reactivity of BS-85a to the partial structure of  $\beta$ -amyloid (25-35) (antigen concentration giving  $(B/B_0)=0.5$ : 20 nM, 1 ng/well) was 40 times the reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40) (antigen concentration giving  $(B/B_0)=0.5$ : 800 nM, 160 ng/well) (Fig. 6 (b)).

#### (2) Competitive Method-EIA (2)

The reaction specificity of the anti- $\beta$ -amyloid (1-16) monoclonal antibody was examined in a manner similar to that described above. First, the antibody titer of each



monoclonal antibody solution was examined according to the method described in Example (5) 3, and the antibody concentration (about 3 to 50 ng/ml) in which the amount of the labeled material bound reached about 40% of the

5 saturated amount bound was determined as the antibody concentration used in the competitive method-EIA. Then, 50  $\mu$ l of an antibody solution diluted with buffer C to the determined concentration, 50  $\mu$ l of a buffer C solution of the  $\beta$ -amyloids or the partial peptides thereof, namely  $\beta$ -

10 amyloid (1-40),  $\beta$ -amyloid (1-28) and [Cys<sup>17</sup>]  $\beta$ -amyloid (1-16), and 50  $\mu$ l of HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (1-16) described in Example 4 (2) mentioned above (2000-fold dilution with buffer C) were added to each well of the anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate, followed by

15 reaction at 4°C for 16 hours. After reaction, the plate was washed with PBS, and then the enzyme activity on the solid phase was assayed by the method described in Example 5 (3) mentioned above. Results are shown in Table 2. Of the eight kinds of monoclonal antibodies first selected,

20 the four kinds thereof also reacted with  $\beta$ -amyloid (1-40) relatively highly, and of the sixteen kinds of monoclonal antibodies thereafter newly selected, the ten kinds thereof also reacted with  $\beta$ -amyloid (1-40) relatively highly (Table 2). As typical examples, the results of the competitive

25 method-EIA of monoclonal antibodies BAN-052a (IgG1,  $\kappa$ ) and BAN-50a (IgG1,  $\kappa$ ) which showed the highest reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40) among these antibodies are shown in Fig. 7.

Fig. 7 shows that these antibodies have a similar degree of reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40),  $\beta$ -amyloid (1-28) and  $\beta$ -amyloid (1-16). Further,  $\beta$ -amyloid (1-40) standard curves in the competitive method-EIA are shown in Fig. 8, in which the three kinds of monoclonal antibodies BAN-11a (IgG1,  $\kappa$ ), BAN-20a (IgG1,  $\kappa$ ) and BAN-30a (IgG1,  $\kappa$ ) first selected and showing a high reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40) were used, in addition to these two kinds of antibodies. The  $\beta$ -amyloid (1-40) concentration of these antibodies giving  $(B/B_0)=0.5$  was within the range of 25 to 70 nM (5-15 ng/well), and only a difference of less than 3 times was observed among the antibodies. Of these, the competitive method-EIA using BAN-50a was most highly sensitive, and could detect about 0.6 ng/well [ $(B/B_0)=0.9$ ] of  $\beta$ -amyloid (1-40).

### 15 (3) Competitive Method-EIA (3)

From 10 g of the brain of a patient with Alzheimer's disease, 0.1 g of  $\beta$ -amyloid fractions (formic acid extracts) was obtained according to the method of Mori et al. (see the text). Then, according to the method described in Example 7 (2) mentioned above, the anti-mouse immunoglobulin antibody-binding microplate, the antibody solution, the  $\beta$ -amyloids or the partial peptide thereof, namely  $\beta$ -amyloid (1-40) and [Cys<sup>34</sup>]  $\beta$ -amyloid (35-43) or the above-mentioned Alzheimer's disease patient's brain-derived  $\beta$ -amyloid fraction, and HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (35-43) described in Example 4 (3) mentioned above (50-fold dilution with buffer C) were allowed to react. Results are

shown in Table 3. Of the monoclonal antibodies first selected, the four kinds of antibodies relatively highly reacted with the Alzheimer's disease patient's brain-derived  $\beta$ -amyloid fraction. Of these, monoclonal antibody BC-05a (IgG1,  $\kappa$ ) which exhibited a high antibody titer was selected, and used in the following experiment.

(4) Competitive Method-EIA (4)

The reaction specificity of the anti- $\beta$ -amyloid (18-28) monoclonal antibody was examined by the method described in Example 7 (2) mentioned above. That is, after determination of the concentration of each antibody, reaction was conducted using  $\beta$ -amyloid (1-40), [Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -amyloid (17-28) (Accord), [Cys<sup>29</sup>]  $\beta$ -amyloid (18-28) and  $\beta$ -amyloid (1-28) as the  $\beta$ -amyloids or the partial peptides thereof, and using HRP-labeled  $\beta$ -amyloid (18-28) described in Example 4 (4) mentioned above (1000-fold dilution with buffer C) as the labeled antigen, followed by assay of enzyme activity. Results are shown in Table 4. All of the nine kinds of antibodies selected had a high reactivity to  $\beta$ -amyloid (18-28) which is an antigen. Further, of these, the five kinds of antibodies relatively highly reacted also with  $\beta$ -amyloid (17-28). All of the antibodies did not react with  $\beta$ -amyloid (1-28) and  $\beta$ -amyloid (1-40).

Of these, monoclonal antibody BP-90a (IgG1,  $\kappa$ ) having a high reactivity with both  $\beta$ -amyloid (17-28) and  $\beta$ -amyloid (18-28) were mainly used in the subsequent experiments.

[Example 8] Preparation of HRP-Labeled-Anti- $\beta$ -Amyloid  
Monoclonal Antibody

(1) BS-85a-HRP

To 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) containing 4.2 mg  
5 (28 nmols) of a purified BS-85a fraction was added 50  $\mu$ l of  
DMF containing 420 nmols of GMBS, followed by reaction at  
room temperature for 40 minutes. The reaction solution was  
separated on a Sephadex G-25 column (eluent: 0.1 M  
phosphate buffer, pH 6.7) to obtain 3 mg of a fraction of a  
10 maleimide group-introduced antibody. Then, 50  $\mu$ l of DMF  
containing 4.5  $\mu$ mol of SPDP was added to 1.4 ml of 0.02 M  
phosphate buffer (containing 0.15 M NaCl, pH 6.8)  
containing 12 mg (300 nmols) of HRP, followed by reaction  
at room temperature for 40 minutes. Then, 0.5 ml of 0.2 M  
15 acetate buffer (pH 4.5) containing 68  $\mu$ mol of  
dithiothreitol was added thereto and allowed to react for  
20 minutes at room temperature, followed by separation on a  
Sephadex G-25 column (eluent: 0.1 M phosphate buffer  
containing 2 mM EDTA, pH 6) to obtain 8 mg of SH group-  
20 introduced HRP. Subsequently, 8 mg of SH group-introduced  
HRP was mixed with 3 mg of the fraction of the maleimide  
group-introduced antibody, and the mixture was concentrated  
by a collodion bag (Sartorius) to about 0.3 ml, followed by  
standing at 4°C for 16 hours. The reaction solution was  
25 subjected to an Ultrogel Aca34 column in which 0.1 M  
phosphate buffer (pH 6.5) was used as an eluent, thereby  
purifying a BS-85a-HRP complex fraction.

(2) BA-27a-HRP

Using 4.7 mg of a purified BA-27a fraction and 14 mg of HRP, a BA-27a-HRP complex fraction was prepared in a similar manner.

5 (3) BAN-052a-HRP

Using 5 mg of a purified BAN-052a fraction and 14 mg of HRP, a BAN-052a-HRP complex fraction was prepared in a similar manner.

(4) BC-05a-HRP

10 Using 5 mg of a purified BC-05a fraction and 14 mg of HRP, a BC-05a-HRP complex fraction was prepared in a similar manner.

[Example 9] Sandwich Method-EIA (1)

(1) Sandwich Method-EIA Using BS-85a-HRP

15 Into each well of a 96-well microtiter plate was poured 100  $\mu$ l of 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) containing purified monoclonal antibody BAN-052a, BAN-11a, BAN-20a, BAN-30a, BS-85a or BA-27a described in Example 6 mentioned above, followed by standing at 4°C for 24 hours. Then, 300  
20  $\mu$ l of Block Ace diluted 4 times with PBS was added to inactivate excess binding sites of the wells.

To the plate prepared as described above was added 100  $\mu$ l of a standard solution of  $\beta$ -amyloid (1-40) diluted with buffer E (0.02 M phosphate buffer containing 10% Block Ace,  
25 0.2% BSA, 0.4 M NaCl, 0.05% CHAPS and 0.05% NaN<sub>3</sub>), followed by reaction at 4°C for 24 hours. After washing with PBS, 100  $\mu$ l of BS-85a-HRP prepared in Example 8 (1) (1500-fold

dilution with buffer C) was added, followed by reaction at 4°C for 24 hours. After washing with PBS, the enzyme activity on the solid phase was assayed using TMB by the method described in Example 5 (3) mentioned above (enzyme reaction: 20 minutes). Results are shown in Fig. 9. As described in Example 7, the reactivity of BS-85a to  $\beta$ -amyloid (1-40) in the competitive method-EIA is not so high. However, when used as the labeled antibody in the sandwich method-EIA in which the monoclonal antibody using  $\beta$ -amyloid (1-16) as the antigen was in the solid phase as described above, it detected  $\beta$ -amyloid (1-40) with an extremely high sensitivity. In particular, the use of the solid phase of BAN-052a resulted in a sensitivity 10 to 30 times higher than that of the other three kinds of antibody solid phases, and it was possible to detect 3 pg/well of  $\beta$ -amyloid (1-40).

#### (2) Sandwich Method-EIA Using BA-27a-HRP

Similarly, 100  $\mu$ l of the standard solution of  $\beta$ -amyloid (1-40) was added to the microplate to which BAN-052a, BAN-11a, BAN-20a, BAN-30a, BS-85a or BA-27a was fixed, followed by reaction at 4°C for 24 hours. After washing with PBS, 100  $\mu$ l of BA-27a-HRP prepared in Example 8 (2) described above (2500-fold dilution with buffer C) was added, followed by reaction at 4°C for 24 hours. After washing with PBS, the enzyme activity on the solid phase was assayed using TMB (enzyme reaction: 20 minutes). Results are shown in Fig. 10. Similarly with BS-85a, BA-

27a did not show a high reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40) in the competitive method-EIA. However, when used as the labeled antibody in the sandwich method-EIA as described above, it detected  $\beta$ -amyloid (1-40) with a sensitivity  
 5 higher than BS-85a. In particular, the use of the solid phase of BAN-052a resulted in a sensitivity about 30 times higher than that of the other three kinds of antibody solid phases, and it was possible to detect 0.6 pg/well of  $\beta$ -amyloid (1-40).

10 (3) Sandwich Method-EIA Using BAN-052a-HRP

To the microplate to which BS-85a or BA-27a was fixed, 100  $\mu$ l of the standard solution of  $\beta$ -amyloid (1-40) was added, followed by reaction at 4°C for 24 hours. After washing with PBS, 100  $\mu$ l of BAN-052a-HRP prepared in  
 15 Example 8 (3) described above (2500-fold dilution with buffer C) was added, followed by reaction at 4°C for 24 hours. After washing with PBS, the enzyme activity on the solid phase was assayed using TMB (enzyme reaction: 20 minutes). Results are shown in Fig. 11. Thus, also in the  
 20 system constructed reversely to that of Example 8 (2), namely in the sandwich method-EIA in which the C-terminal antibody such as BS-85a or BA-27a was used as the solid phase and the N-terminal antibody, BAN-052a, was used as the labeled material, it was possible to detect 80 pg/well  
 25 and 10 pg/well of  $\beta$ -amyloid (1-40), respectively.

Further, when BAN-052a-HRP (1000-fold dilution with buffer C) was also used as the labeled material in the

sandwich method-EIA using BAN-052a as the solid phase, the detection sensitivity fell to 1/100, compared with the case that BA-27a-HRP (1500-fold dilution with buffer C) was used. This suggests that a multimer of  $\beta$ -amyloid (1-40),  
5 scarcely exists under the experimental conditions used in the present invention (Fig. 12).

[Example 10] Sandwich Method-EIA (2)

From the fact that, of the anti- $\beta$ -amyloid (1-16) monoclonal antibodies, BAN-052a provided the sandwich  
10 method-EIA having an extremely high sensitivity, sixteen kinds of antibodies were further prepared to select anti- $\beta$ -amyloid (1-16) monoclonal antibodies more suitable for the sandwich method-EIA (Table 2). As a result, BAN-50a was  
15 obtained. Results of the sandwich method-EIA using BAN-50a as the solid antibody are shown in Fig. 13 and Fig. 14. Although the assay was conducted according to Example 9 (3) described above, 1000-fold dilution (Fig. 13) was used as the concentration of the labeled material for BS-85a-HRP, and 1500-fold dilution (Fig. 14) for BA-27a-HRP. Further,  
20 in order to examine the specificity of these assay systems, the reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-28) was also examined [in the figures, ● and ▲ indicate the reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-40), and ○ and △ indicate the reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-28)]. As a result, even when either of the labeled  
25 materials was used, the sensitivity for the BAN-50a solid phase was 2 to 3 times higher than that for the BAN-052a solid phase. When it was combined with the BA-27a-HRP



labeled material, it was possible to detect 0.2 pg/well of  $\beta$ -amyloid (1-40). Further, the results showed that all the assay systems did not detect  $\beta$ -amyloid (1-28), and was specific for  $\beta$ -amyloid (1-40).

5 [Example 11] Sandwich Method-EIA (3)

(1) Specificity of Sandwich Method-EIA Using BS-85a-HRP or BA-27a-HRP

The specificity of two kinds of sandwich method-EIA systems was examined in more detail in which BAN-50a was  
 10 used as a solid phase antibody and BS-85a-HRP or BA-27a-HRP was used as a labeled material. Although the assay was conducted according to Example 10 described above, 670-fold dilution was used as the concentration of the labeled material for BS-85a-HRP, and 1000-fold dilution for BA-27a-  
 15 HRP, and the reactivity to  $\beta$ -amyloid (1-38),  $\beta$ -amyloid (1-39),  $\beta$ -amyloid (1-40),  $\beta$ -amyloid (1-42) and  $\beta$ -amyloid (1-28) was examined (Figs. 15 (a) and 15 (b)), wherein  $\beta$ -amyloid (1-38) and  $\beta$ -amyloid (1-39) prepared in Example 1 (5) were used. The concentration of  $\beta$ -amyloid (1-38) and  
 20  $\beta$ -amyloid (1-39) in respective fractions of reverse-phase HPLC corresponding thereto in Example 1 (5) was determined by the competitive method-EIA using BAN-50a according to the method of Example 7 (2). Results revealed that the assay system using BS-85a-HRP as the labeled material (Fig.  
 25 15 (a)) detected  $\beta$ -amyloid (1-38),  $\beta$ -amyloid (1-39) and  $\beta$ -amyloid (1-40) with an almost similar sensitivity (0.7 pg/well), and that it detected  $\beta$ -amyloid (1-42) with a

sensitivity one-half to one-third that of the above-mentioned three kinds of  $\beta$ -amyloids. Furthermore,  $\beta$ -amyloid (1-28) was not detected at all, giving results similar to those of Example 10. On the other hand, the

5 assay system using BA-27a-HRP as the labeled material (Fig. 15 (b)) detected  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42) with sensitivities of 0.2 pg/well and 18 pg/well, respectively. Further, for  $\beta$ -amyloid (1-38) and  $\beta$ -amyloid (1-39), it was possible to detect with sensitivities of 85 pg/well and 17

10 pg/well, respectively.

The above-mentioned results showed that the assay system using BS-85a-HRP as the labeled material was non-specific for the C-terminal portions of the  $\beta$ -amyloids, and that it was approximately equivalently sensitive to the  $\beta$ -

15 amyloids containing the sequence of  $\beta$ -amyloid (25-35) which was a partial peptide used as the immunogen to the labeled antibody. On the other hand, the assay system using BA-27a-HRP as the labeled material was considered to be

20 specific for the C-terminus of  $\beta$ -amyloid (1-40), and weakly reacted to  $\beta$ -amyloid (1-38),  $\beta$ -amyloid (1-39) and  $\beta$ -amyloid (1-42) with a cross reactivity of 2% or less.

#### (2) Specificity and Sensitivity of Sandwich Method-EIA Using BC-05a-HRP

The specificity and sensitivity of a sandwich method-

25 EIA was examined in which BAN-50a was used as a solid antibody and BC-05a-HRP prepared in Example 8 (4) described above was used as a labeled material. The reactivity to  $\beta$ -

amyloid (1-38),  $\beta$ -amyloid (1-39),  $\beta$ -amyloid (1-40).  $\beta$ -amyloid (1-42) and  $\beta$ -amyloid (1-28) was examined in the same manner as with Example 11 (1) described above with the exception that 200-fold dilution was used as the

5 concentration of the labeled material (Fig. 15 (c)). As a result, the sandwich method-EIA using BC-05a-HRP could detect 0.7 pg/well of  $\beta$ -amyloid (1-42), but it did not detect the four kinds of  $\beta$ -amyloids other than  $\beta$ -amyloid (1-42), namely  $\beta$ -amyloid (1-38),  $\beta$ -amyloid (1-39),  $\beta$ -

10 amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-28), at all. Hence, this proved that the sandwich method-EIA using BAN-50a as the solid antibody and BC-05a-HRP as the labeled material could detect  $\beta$ -amyloid (1-42) with an extremely high sensitivity and selectivity.

15 The above-mentioned results showed that  $\beta$ -amyloid (1-40) and  $\beta$ -amyloid (1-42) could be separately determined by combining the two kinds of assay systems in which BAN-50a was used as the solid antibody and BA-27a-HRP or BC-05a-HRP was used as the labeled material.

20 [Example 12] Preparation of Monoclonal Antibody-Fixed Affinity Solid Phase.

(1) Preparation of BAN-052a-Fixed Affinity Solid Phase

BAN-052a was fixed to a resin, thereby preparing an affinity solid phase. Namely, 45 mg of BAN-052a was

25 allowed to react with 5 g of TSKgel AF-Trecyltoyopearl 650M (Toso) in a 0.1 M aqueous solution of sodium hydrogencarbonate containing 0.5 M NaCl, overnight at 4°C.

After reaction, the product was washed with 0.5 M saline, and allowed to react in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.5 M NaCl at room temperature for 1 hour to block excess active groups. Then, 25 ml of BAN-052a-Trecyltoyopearl  
5 thus obtained was washed with PBS, followed by storage in buffer E at 4°C.

(2) Preparation of BA-27a Fixed Affinity Solid Phase

Similarly to (1) described above, BA-27a was fixed to a filler, thereby preparing an affinity solid phase.

10 Namely, 15 mg of BA-27a was allowed to react with 2 g of TSKgel AF-Trecyltoyopearl 650M to obtain 10 ml of BA-27a-Trecyltoyopearl.

[Example 13] Analysis of  $\beta$ -Amyloids Contained in Cerebrospinal Fluid of Patient with Alzheimer's Disease

15 The cerebrospinal fluid of a patient with Alzheimer's disease purified by the use of the BAN-052a fixed affinity solid phase prepared in Example 12 (1) described above was fractionated by reverse-phase HPLC, and analyzed by the sandwich-EIA.

20 First, 1.5 ml of the cerebrospinal fluid of a patient with Alzheimer's disease was diluted twice with buffer E, followed by elution from a column (0.8 X 0.3 cm) filled with BAN-052a-Trecyltoyopearl for partial purification. As an eluent, 60% acetonitrile containing 0.2% trifluoroacetic  
25 acid was used. Then, after concentration, these eluted fractions were separated by reverse-phase HPLC using Vydac C4 according to the method described in Example 1 (5), and

$\beta$ -amyloids contained in the eluted fractions were determined by the sandwich method-EIA using the BAN-50a binding solid phase and BS-85a-HRP or BA-27a-HRP described in Example 10. Results are shown in Fig. 16. Fraction No. 5 59 approximately agreed with the elution position of synthetic  $\beta$ -amyloid (1-40), so that the immunological activity detected in both of Figs. 16 (a) and 16 (b) was considered to be that to  $\beta$ -amyloid (1-40). The results of Fig. 16 therefore showed that  $\beta$ -amyloid (1-40) existed at a 10 high concentration in the cerebrospinal fluid of the patient with Alzheimer's disease. Fig. 16 (a) further revealed that molecular species which were detectable with BS-85a-HRP alone were also contained in small amounts (fraction Nos. 47 and 48). These are eluted at 15 acetonitrile concentrations lower than that at which  $\beta$ -amyloid (1-40) was eluted. Accordingly, materials eluted in fraction Nos. 47 and 48 are considered to be molecular species more hydrophilic than  $\beta$ -amyloid (1-40). The results of Example 11 showed that the assay system using 20 BS-85a-HRP as the labeled material was also sensitive to a molecular species lacking one or two residues from the C-terminus of  $\beta$ -amyloid (1-40), equivalently to  $\beta$ -amyloid (1-40). The possibility is therefore high that the immunological activity observed in fraction Nos. 47 and 48 25 is that to the molecular species lacking the C-terminal portion of  $\beta$ -amyloid (1-40).

[Example 14] Analysis of  $\beta$ -Amyloids Fractions Derived from

# Cerebrospinal Fluid of Patient with Alzheimer's Disease

In formic acid was dissolved 11 mg of the Alzheimer's disease patient's brain-derived  $\beta$ -amyloid fractions (the formic acid extracts) described in Example 7 (3) mentioned above, and separated by gel filtration using TSK G3000PW.

## Column conditions

Column: TSK G3000PW (Toso)

Eluents: 40% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid

Flow rate: 0.5 ml/minute

$\beta$ -Amyloids contained in the eluted fractions were by the sandwich method-EIA using BAN-50a antibody binding solid phase and BS-85a-HRP described in Example 10 mentioned above. As a result, a high immunological activity was observed between 14 minutes and 15 minutes of HPLC elution time. Then, 0.05% CHAPS was added to this fraction, followed by concentration, and separation was conducted by reverse-phase HPLC using Vydac C4 according to the method described in Example 1 (5). Results of elution are shown in Fig. 17.

After 300  $\mu$ l of each of the resulting fractions of No. 35 and Nos. 41 to 45 was concentrated, the concentrated fractions were subjected to mass spectrometry (HX110, JEOL). Results of analysis for the fractions of No. 35, No. 41 and No. 43 are shown in Fig. 18.  $\beta$ -Amyloid (1-40) was the major constituent for No. 35,  $\beta$ -amyloid (1-42) for No. 41. For No.43,  $\beta$ -amyloid (3-42) was the major

constituent (the N-terminal of  $\beta$ -amyloid (3-42) was estimated to be converted to pyroglutamic acid, because the molecular weight was smaller by 18 than expected).

Further, No.43 contained other minor molecular species lacking the N-terminal portions as mixtures. Furthermore, the elution position of No. 35 agreed with that of synthetic  $\beta$ -amyloid (1-40).

Then, the immunological activity of the eluted fractions was examined by the method described in Example 11 mentioned above. In this case, 3  $\mu$ l of each of the fractions was used as a sample, and BC-05a-HRP was used as 200-fold dilution. Results are shown in Fig. 19. Both the peaks of No. 35 and Nos. 41-45 were detected in the assay system using BS-85a, the peak of No. 35 was mainly detected in the assay system using BA-27a, and the peak of Nos. 41-45 was detected in the assay system using BC-05a.

The above-mentioned results are based on the specificity of the respective assay systems shown in Example 11, which indicates, together with Example 13, that the assay systems according to the present invention can provide important means for developments of drugs for diagnosis and elucidation of causes of Alzheimer's disease, and prevention and treatment of Alzheimer's disease.

[Example 15] Cloning of Human Type Amyloid Protein Precursor (APP) Gene

$\beta$ -Amyloids are only parts of a giant precursor protein (APP), and five kinds of cDNAs coding for APP have hitherto

010799  
- 99 -

been discovered. These cDNAs called APP695, APP714, APP751, APP770 and APP563 are known to be produced from the same APP gene as a result of alternative splicing. Of these, in order to construct plasmid DNA for high  
5 expression of human type APP695, a human APP695 gene was cloned.

First, using plasmid pME18s having a strong SR $\alpha$  promoter [Molecular and Cellular Biology, 8, 466-472 (1988)] as a vector, a cDNA library of MAC10, human lung  
10 cancer cell-derived cells, was prepared. Based on the cDNA nucleotide sequence of human APP already reported, a synthetic DNA having the following sequence upstream from a region coding for the protein (sense):

5'-ATCCCACTCGCACAGCAGCGCACTC-3' (SEQ ID NO: 13)

15 and the following sequence downstream therefrom (antisense):

5'-TGCTGTCCAACTTCAGAGGCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 14)

were prepared, and using these as a probe, the above-mentioned cDNA library was screened. The resulting cDNA  
20 was cloned, and the nucleotide sequence thereof was determined by the synthetic chain termination method. As a result, all were cDNAs coding for APP751. Then, a cDNA library of the human fetal brain prepared using  $\lambda$ gt10 as a vector (Stratagene) was screened in a similar manner. As a  
25 result, cDNA coding for APP695 was obtained. The cDNA sequence of APP751 completely agreed with that of APP695, except a protease inhibitor region. Accordingly, a plasmid



DNA having cDNA of APP751 and a phage DNA having cDNA of APP695 were cleaved and recombined to construct a plasmid DNA in which the cDNA of APP695 was ligated downstream from the SR $\alpha$  promoter.

5 [Example 16] Breeding of Human APP695 High Expression Rat C6 Glioma Cells

Rat C6 glioma cells (ATCC CCL 107) were cultivated on a culture dish 10 cm in diameter at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>, in DMEM containing 10% bovine fetal serum. With 1  
10  $\mu$ g of plasmid DNA pTB6 [Cell Structure and Function, 12, 205-217 (1987)] having a neomycin-resistant gene was mixed 20  $\mu$ g of plasmid DNA for high expression of human APP695 constructed in Example 15 described above, and the mixture was introduced into C6 glioma cells cultivated to 80%  
15 saturation, by calcium phosphate coprecipitation method. After 24 hours, neomycin (GIBCO) was added to give a final concentration of 750  $\mu$ g/ml, and cultivation was continued to select resistant strains. Each of 18 selected strains thus obtained was suspended in 100  $\mu$ l of PBS. After  
20 lyophilization and ultrasonic treatment, SDS electrophoresis was carried out using 8% polyacrylamide gel. After transcription of the protein to a nitrocellulose membrane, western blot analysis using an anti-human APP mouse monoclonal antibody (Boehringer  
25 Mannheim) was carried out to obtain C6-695-18 highest in the expression amount of APP695.

[Example 17] Detection of 3-kDa Peptide Contained in

410795  
- 101 -

Culture Supernatant of Human APP695 High Expression C6  
Glioma Cells

In order to identify molecular species of  $\beta$ -amyloids contained in a culture supernatant of the human APP695 high expression C6 glioma cells described in Example 16 mentioned above, the culture supernatant was purified in a manner similar to that of Example 13, and analyzed by the sandwich method-EIA. Namely, 1 liter of the culture supernatant was partially purified by a column filled with BA-27a-Trecyltoyopearl obtained in Example 12 (2) described above, and the resulting eluted fractions were concentrated, followed by fractionation by reverse-phase HPLC using Vydac C4.

Column conditions

Column: Vydac C4 (4.6 X 250 mm)  
Eluents: A (5% acetonitrile containing 0.1% aqueous trifluoroacetic acid)  
B (80% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid)  
Elution Method: The concentration of eluent B was first increased from 15% to 25% for 5 minutes, and then linearly increased to 25-50% for 60 minutes.

Flow rate: 0.5 ml/minute

Using a 96-well microplate to which BP-90a was solidified, and BA-27a-HRP as a labeled material, according to the method described in Example 9 (1), the above-

8210795  
- 102 -

mentioned reverse-phase HPLC fractions were subjected to the sandwich method-EIA. Fraction No. 28 and Nos. 38-39 in which a high immunological activity was observed were concentrated and subjected to mass spectrometry. As a  
5 result,  $\beta$ -amyloid (20-40) or  $\beta$ -amyloid (18-40) was a main constituent for each fraction. The above-mentioned results showed that the sandwich method-EIA using BP-90a and BA-27a could selectively detect derivatives on the C-terminal side of the  $\beta$ -amyloid. This assay system is therefore  
10 considered to provide important means when metabolism of APP is studied.

#### Industrial Applicability

As lesion characteristic of the brains of patients  
15 with Alzheimer's disease, deposition of the  $\beta$ -amyloid which is one of the main constituents of senile plaque has been known. By using the monoclonal antibodies of this invention, the  $\beta$ -amyloids having the C-terminal hydrophobic regions can be determined sensitively and specifically, and  
20 this determination method is useful for diagnosis of Alzheimer's disease, etc.